

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-107983

(43) 公開日 平成7年(1995)4月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/54	Z N A			
5/10				
9/12		9359-4B		
9/99		9152-4B		
C 1 2 Q 1/48	Z	6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数29 O L (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-322784

(22) 出願日 平成5年(1993)12月21日

(31) 優先権主張番号 0 9 7 9 9 7

(32) 優先日 1993年7月29日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

特許法第30条第1項適用申請有り 1993年6月22日~6月26日 メアリーランド州、フレデリックのフッド大学開催の「第9回腫瘍遺伝子学会」において文書をもって発表

(71) 出願人 593230316

セント・ジュード・チルドレンズ・リサーチ・ホスピタル

St. Jude Children's Research Hospital

アメリカ合衆国38101-0318テネシー州メンフィス、ノース・ローダーデイル332番

(72) 発明者 ジェイムズ・エヌ・イール

アメリカ合衆国38119テネシー州メンフィス、リバービュー・ロード410番

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 J a k キナーゼおよびサイトカインシグナル形質導入の調節

(57) 【要約】

【目的】 J a k キナーゼおよびサイトカインシグナル形質導入の制御方法を提供する。

【構成】 真核性細胞のインターファロン α (I F N α) 以外のサイトカイン類に対する生物学的応答を制御する方法であって、該応答を仲介する J a k キナーゼの活性を阻害または高めることを含む方法。

【効果】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 真核性細胞のインターフェロン α (IFN α) 以外のサイトカイン類に対する生物学的応答を阻害する方法であって、該応答がJ a kキナーゼの活性化によって仲介されるものであるとき、該真核性細胞の該J a kキナーゼの活性を阻害することを含む方法。

【請求項2】 該サイトカインが、チロシンキナーゼ受容体ファミリーのメンバーとの結合によって該生物学的応答を引き出すサイトカイン群から選択されるものである請求項1の方法。

【請求項3】 該サイトカインが、サイトカイン受容体スーパーファミリーのメンバーとの結合によって該生物学的応答を引き出すサイトカイン群から選択されるものである請求項1の方法。

【請求項4】 該J a kキナーゼがJ a k 1、J a k 2、およびTy k 2からなる群から選択されるものである請求項1の方法。

【請求項5】 該J a kキナーゼがJ a k 2である請求項4の方法。

【請求項6】 該サイトカインがインターロイキン-3 (I L-3)、顆粒球-マクロファージ特異的コロニー刺激因子 (G M-C S F)、エリスロポイエチン (E p o)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F)、インターフェロン- γ (I F N- γ)、プロラクチンホルモン、および成長ホルモンからなる群から選択されるものである請求項5の方法。

【請求項7】 該真核性細胞内の該J a kキナーゼの発現を阻害し得る組成物の有効量を該真核性細胞に導入することによって、該J a kキナーゼの活性を阻害する請求項1の方法。

【請求項8】 該組成物が、アンチセンスRNAおよびリボチームからなる群から選択されるものである請求項7の方法。

【請求項9】 該J a kキナーゼの活性を阻害し得る組成物の有効量を該真核性細胞に導入することによって、該J a kキナーゼの活性を阻害する請求項1の方法。

【請求項10】 該組成物が、該J a kキナーゼに対する抗体、該J a kキナーゼのアンタゴニスト、該J a kキナーゼのトランス-優性突然変異体、および該J a kキナーゼのペプチドフラグメントからなる群から選択される請求項9の方法。

【請求項11】 該J a kキナーゼの活性化を阻害し得る組成物の有効量を該真核性細胞に導入することによって、該J a kキナーゼの活性を阻害する請求項1の方法。

【請求項12】 該組成物が、該J a kキナーゼに対する抗体、該J a kキナーゼのアンタゴニスト、該J a kキナーゼのトランス-優性突然変異体、および該J a kキナーゼのペプチドフラグメントからなる群から選択される請求項11の方法。

【請求項13】 J a kキナーゼの活性化によってその活性が仲介されるサイトカインに対する、真核性細胞の過剰応答に起因する疾病状態を治療する方法であって、該真核性細胞内の該J a kキナーゼの活性を阻害することを含む方法。

【請求項14】 該疾病状態が該真核性細胞の過剰増殖である請求項13の方法。

【請求項15】 真核性細胞の、その活性がJ a kキナーゼの活性化に仲介されるインターフェロン α (I F N α) 以外のサイトカイン類に対する応答の欠失を治療する方法であって、該応答の欠失が該サイトカインに接触した後に該真核性細胞内に存在する活性化形の該J a kキナーゼの濃度が異常に低いことに起因するとき、該真核性細胞内のJ a kキナーゼ濃度を増大することを含む方法。

【請求項16】 該J a kキナーゼの該真核性細胞内の濃度を、該真核性細胞内のJ a kキナーゼの発現を高めることにより増大させる請求項15の方法。

【請求項17】 該真核性細胞内で該J a kキナーゼを発現させることができるベクターを導入することにより、該J a kキナーゼの発現を高める請求項16の方法。

【請求項18】 その活性がJ a kキナーゼの活性化によって仲介されるサイトカインに対する真核性細胞の生物学的応答を阻害することができる組成物を同定するための検定法であって、該組成物の該J a kキナーゼのインビトロのキナーゼ活性阻害能力を検出することを含む方法。

【請求項19】 請求項18の検定法であって、

(a) 活性化形の該J a kキナーゼ、該J a kキナーゼの基質、および γ 位のりんが検出可能に標識されたアデノシン三りん酸 (A T P)、全部をキナーゼバッファー中で混合してなる第1反応混合物を調製し；

(b) 該第1反応混合物と、該組成物とを混合してなる第2反応混合物を調製し；そして

(c) 該第1反応混合物および該第2反応混合物中の、該検出可能に標識されたりんを含有する該基質を検出することからなる工程を含む方法、ここに、該第2反応混合物中の、該検出可能に標識されたりんを含有する該基質の含有量が、該第1反応混合物中のそれよりも有意に少なければ、該組成物は、該J a kキナーゼの活性化によってその活性が仲介されるサイトカインに対する真核性細胞の生物学的応答を阻害し得るものと同定される。

【請求項20】 該基質が該J a kキナーゼまたは、該J a kキナーゼの自己りん酸化部位を含むフラグメントである請求項19の方法。

【請求項21】 該J a kキナーゼがJ a k 2であり、該フラグメントが該J a k 2 (配列番号2) のアミノ酸1000-1015を含むものである請求項20の方法。

【請求項22】 その活性がJ a k キナーゼの活性化によって仲介されるサイトカインに対する真核性細胞の生物学的応答を阻害することができる組成物を同定するための検定法であって、該組成物の該活性化を阻害する能力を検出することを含む方法。

【請求項23】 請求項22の検定法であって、

(a) 該サイトカインによる刺激の後、該真核性細胞の第1集団から、該J a k キナーゼおよび該J a k キナーゼの基質を含有する第1抽出物を調製し；

(b) 該サイトカインによる刺激の後の該真核性細胞の第2集団であって、該刺激の前または間に該組成物が加えられた第2集団から、該J a k キナーゼおよび該J a k キナーゼの基質を含有する第2抽出物を調製し；

(c) 該第1抽出物と、 γ 位のりんが検出可能に標識されたアデノシン三リン酸(ATP)をキナーゼバッファー中で混合してなる第1反応混合物を調製し；

(d) 該第2抽出物と、 γ 位のりんが検出可能に標識されたアデノシン三リン酸(ATP)をキナーゼバッファー中で混合してなる第2反応混合物を調製し；そして

(e) 該第1および該第2反応混合物中の、該検出可能に標識されたりんを含有する該基質を検出することからなる工程を含む方法、ここに、該第2反応混合物中の、該検出可能に標識されたりんを含有する該基質の含有量が、該第1反応混合物中のそれよりも有意に少なければ、該組成物は、該J a k キナーゼの活性化によってその活性が仲介されるサイトカインに対する真核性細胞の生物学的応答を阻害し得るものと同定される。

【請求項24】 その活性がJ a k キナーゼの活性化によって仲介されるサイトカインに対する真核性細胞の生物学的応答を阻害することができる組成物を同定するための検定法であって、該サイトカインの存在下、該組成物の、該J a k キナーゼと該サイトカインの受容体との物理的相互作用を阻害する能力を検出することを含む方法。

【請求項25】 J a k キナーゼから誘導された、J a k 1のアミノ酸786-804(配列番号6)、J a k 2のアミノ酸758-776(配列番号5)、およびT y k 2の配列番号819-837(配列番号7)からなる群から選択されるペプチドに対して惹起され、該J a k キナーゼの活性を阻害することなく該J a k キナーゼに特異的に結合することができる抗体。

【請求項26】 完全長さのJ a k 2キナーゼをコードするDNA配列を含有する単離されたDNA分子。

【請求項27】 該DNA配列が図1-3(配列番号8)に示されるネズミJ a k 2遺伝子配列から誘導されたものである、請求項26の単離されたDNA分子。

【請求項28】 宿主細胞内でJ a k 2キナーゼを発現することができる請求項26の単離されたDNA分子を含有する発現ベクター。

【請求項29】 請求項28の発現ベクターで形質転換

された宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】連邦援助研究および開発下でなされた発明の権利に対する声明本発明の研究中、研究の一部は糖尿病、消化器および腎臓疾患国立研究所からのグラントN o. R01 DK42932に基づくアメリカ合衆国基金を用いてなされた。従って、アメリカ合衆国は本発明に権利を有するものである。

【0002】

【産業上の利用分野】本発明は概してJ a k ファミリーキナーゼおよびサイトカイン、特にサイトカイン受容体スーパーファミリーに属する受容体に結合するサイトカインが各々の受容体への結合に対する細胞応答に於けるその役割に関する。さらに詳しくは、本発明はJ a k キナーゼファミリーのメンバーのサイトカイン誘導活性化に関し、さらには、特殊なサイトカインとJ a k キナーゼファミリーのメンバーとの相互反応の同定、およびこの相互反応を調節する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】真核細胞の増殖、分化および機能は一般にサイトカインと一般的に呼ばれている細胞外因子により調節されている。これらのサイトカインはそれぞれの受容体に結合することにより細胞性応答を誘導している。サイトカインの受容体は2つの主たるファミリー、つまり、サイトカイン受容体スーパーファミリーとチロシンキナーゼ受容体スーパーファミリーに大別される。

【0004】チロシンキナーゼ受容体スーパーファミリーに属する受容体は、サイトカイン受容体結合シグナルの形質導入に関与する一個の同定できる細胞内チロシンキナーゼドメインの存在を特徴とする。この受容体ファミリーに属する受容体はさらに3つの構造的サブグループに分けられる(ヤーデン, Y., Ann. Rev. Biochem. 57:443-478(1988))。第1サブグループの受容体は、その細胞外ドメイン内の2個のシステインを豊富に含む配列反復領域をもつ単量体として特徴づけられ、上皮増殖因子(EGF)とトランスフォーミング成長因子- α (TGF- α)の受容体があげられる(ウールリッチ, A. ら, Nature 309:418-425(1984))。第2サブグループに属する受容体は異型四量体として機能することを特徴とし、インスリンの受容体(ウールリッチ, A. ら, Nature 313:756-761(1985))；エビナ, Y. ら, Cell 40:747-758(1985))、およびインスリン様増殖因子-1(IGF-1)(ウールリッチ, A. ら, EMBO J. 5:2503-2512(1986))があげられる。第3サブグループに属する受容体は、固定反復構造の存在とその長鎖の挿入配列(77-107個のアミノ酸)によるその触媒ドメインの中断が特徴である。その第3サブグループの受容体として、血小板由来増殖因子

の受容体 (PDGF-R) (ヤーデン, Y. ら, *Nature* 323:226-232 (1986)) とマクロファージ成長因子 (CSF-1) (シェアー, C. J. ら, *Cell* 41:665-676 (1985)) があげられる。

【0005】 サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する受容体は、その細胞外ドメイン中の4個の位置固定システインと1つのWSXWSモチーフ (配列番号: 1) の存在が特徴である。このファミリーは非常に限定された配列相同性を示しシグナル形質導入メカニズムを示し得る同定可能なモチーフを含まない大きさが可変的な細胞内ドメインがまた特徴である。サイトカイン受容体スーパーファミリーの受容体は造血細胞成長因子受容体、成長ホルモン受容体、プロラクチン受容体、繊維好中球因子およびその他を含む (バザン, J. F. ら, *Science* 257:410-413 (1992))。インターフェロン受容体は、さらに僅かな関連ではあるが、この受容体スーパーファミリーに共通する前期体から進化したものと推定されている。

【0006】 触媒ドメインの不足にもかかわらず、サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する受容体のシグナル形質導入はチロシンリン酸化を包含することが多くの研究で示唆されている (ミヤジマ, A. ら, *Annu. Rev. Immunol.* 10:295-331 (1992); メトカフ, D., *Nature* 339:27-30 (1989))。また、この受容体スーパーファミリーに属する受容体がシグナル形質導入に共通のチロシンリン酸化工程を利用し得るという報告もある。特に、造血細胞成長因子の各自の受容体への結合はチロシンリン酸化の相当するパターンを誘導することが判明した (イーレ, J. N., *Interleukins: Molecular Biology and Immunology*, キシモト, T. 編集, Karger, Basel, 65-10ページ (1992))。

【0007】 上記の両ファミリーのサイトカイン受容体が細胞増殖調節で重要な役割を果たすことは広く認められているが、サイトカインの各々の受容体への結合が誘導する生化学的カスケードについては殆ど知られていない。これらの受容体を通じてのサイトカインシグナル形質導入に関与する各段階を理解するは、シグナル形質導入で決定的な役割を演じ、これらのサイトカインの活性を調節する為の標的となり得る分子を同定する上で有用であろう。

【0008】 受容体シグナル形質導入研究の為のモデルとして、造血細胞成長因子のひとつでありサイトカイン受容体スーパーファミリーに属する受容体であるエリスロポイエチン受容体 (EpoR) がある。EpoRをインターロイキン3 (IL-3) 従属細胞系への導入はその細胞にEpoに呼応して増殖する能力を寄与する (ダンドレアら, *Cell* 57:277-285 (198

9); ミウラら, *Mol. Cell Biol.* 11:4895-4902 (1991))。形質転換された細胞において、Epoはc-myc、c-fos、c-pim-1およびegr-1を含む一連の即時型初期遺伝子の発現を誘導する (ミウラら, *Mol. Cell Biol.* 13:1788-1795 (1993))。さらには、Epoは一連の細胞性基質の高速チロシンリン酸化を誘導する (リンネキンら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6237-6241 (1992); デュサンターフォートら, *J. Biol. Chem.* 267:10670-10675 (1992); クエルとボッチョベッキ, *J. Biol. Chem.* 266:609-614 (1991); ミウラら, *Mol. Cell Biol.* 11:4895-4902 (1991); ヨシムラとロッディシュ, *Mol. Cell Biol.* 12:706-715 (1992); デーモンら, *Blood* 80:1923-1932 (1992))。このことは、EpoRがタンパク質チロシンキナーゼの活性化に結合したリガンドをカップリングすることによって機能しているかもしれないことを示唆している。

【0009】 Epo-EpoR結合を伴う生理活性に対するタンパク質チロシンリン酸化の重要性は明確に認められているが、それに関与しているかもしれないキナーゼに関しては殆ど知られていない。EpoRのカルボキシル領域のチロシンリン酸化の高速導入 (ミウラら, *Mol. Cell Biol.* 11:4895-4902 (1991); ヨシムラとロッディシュ, *Mol. Cell Biol.* 12:706-715 (1992); デュサンターフォートら, *J. Biol. Chem.* 267:10670-10675 (1992)) は、受容体がキナーゼと密接に構成的にもまた後続リガンド結合でも会合することを示唆している。ヨシムラとロッディシュの研究 (*Mol. Cell Biol.* 12:706-715 (1992)) では、受容体と架橋し得る130kDaのグリコシル化されていないタンパク質を同定し、それはインビボでチロシンリン酸化され、またインビトロのキナーゼ測定において抗リン酸チロシン抗体で検出され得ることで評価された。130kDaタンパク質がキナーゼかどうかは、依然確定されていない。近年の研究 (リンネキンら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6237-6241 (1992)) により、ATPのチジド誘導体で放射能標識でき得るチロシンリン酸化反応の97kDa基質が同定され、それがキナーゼであると示唆された。130kDaや97kDaポテンシャルキナーゼが先にその特徴を述べたキナーゼであるか否かは、確定されなかった。

【0010】 チロシンリン酸化反応は、サイトカインインターフェロンガンマ (IFN γ) に応答して観察されている。近年の研究 (シュアイら, *Science* 2

59:1808-1812(1992))により、IFN γ が91kDaタンパク質のチロシンリン酸化を誘導し、またこの91kDaタンパク質は核に移動し、 γ 活性化部を結合することが示唆されている。チロシンリン酸化はサイトカイン成長ホルモン(GH)への応答を伴っている。マルチプルタンパク質の高速GH-従属チロシルリン酸化、微小管結合プロテインキナーゼのチロシルリン酸化、および微小管結合プロテインキナーゼ活性の賦活、さらにこれらの作用を成長ホルモン受容体(GHR)結合チロシンキナーゼの阻害剤による阻害を示す3T3-F442A細胞の研究(キャンベル、G. S. ら、J. Biol. Chem. 268:7427-7434(1993))により、GHによるシグナル伝導においてGHR結合チロシンキナーゼ活性が重要な役割を果たすことを示唆されている。さらに、GH処理繊維芽細胞から調製したGH受容体(GHR)との複合体中のチロシンキナーゼ活性の存在が報告されている(カーター、C. ら、J. Biol. Chem. 264:18654-18661(1989); ストレッド、S. E. ら、Endocrinol. 130:1626-1636(1992); ウォン、X. ら、J. Biol. Chem. 267:17390-17396(1992))。ごく最近にも、非受容体型チロシルリン酸化122kdタンパク質がキナーゼ活性GH-GHR製剤中に同定された(ウォン、X. ら、J. Biol. Chem. 268:3573-3579(1993))。

【0011】シグナル形質導入に関与しているかもしれないIL-3-従属細胞に発現するタンパク質チロシンキナーゼスペクトルを同定する為、複製連鎖反応(PCR)が分解性オリゴヌクレオチドと固定タンパク質チロシンキナーゼドメインでなされた(ウィルクス、A. F., Methods Enzymol. 20, 0:533-546(1991))。この手法とノーザンブロット法を用い、IL-3従属細胞がlyn、Tec、c-fes、Jak1およびJak2を含む多くのタンパク質チロシンキナーゼの遺伝子を発現することが認められた(マノ、H. ら、Oncogene 8:417-424(1993))。これらのチロシンキナーゼあるいは依然チロシンキナーゼと同定されていないものがサイトカインシグナル形質導入に関与しているかどうかは、広くは知られていない。

【0012】lynキナーゼのシグナル形質導入への潜在的関与は、IL-3賦活により免疫沈降物中のlynキナーゼ活性が増加することを示した近年の研究により示唆された(トリゴエ、T. ら、Blood 80:617-624(1992))。IL-3従属細胞に発現された他のチロシンキナーゼのうち2つ、Jak1とJak2はキナーゼのJakファミリーに属する。キナーゼのJak(Janus キナーゼ;あるいはjust another kinaseと呼ばれる)ファミリー

は造血細胞中のチロシンキナーゼドメインのPCR増幅中に検知された(ウィルクス、A. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1603-1607(1989))。これらの研究により、主たるPCR増幅生成物が誘導された2個の密接に関連した遺伝子(FD17とFD22;後日Jak2とJak1と命名)が同定された。ヒトJak1遺伝子の完全な構造が報告され(ウィルクス、A. F. ら、Mol. Cell Biol. 11:2057-2065(1991))、また最近、マウスJak2遺伝子の部分配列が公開された(ハーバー、A. G. ら、Oncogene 7:1347-1353(1992))。また別に、そのファミリーの第3のメンバー(Tyk2)がチロシンキナーゼドメインプローブでc-fms遺伝子からcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより単離された(ファームバツハークラフト、I., Oncogene 5:1329-1336(1990))。ファミリーは2個のキナーゼドメインの存在が特徴であり、その1個はタンパク質キナーゼのすべての特徴を持つカルボキシルドメインである。第2のドメインは、まさにアミノ末端であり、タンパク質キナーゼとしてのすべての特徴を持つがしかし有意にタンパク質チロシンとセリン/スレオニンキナーゼとは異なる。キナーゼドメインへのアミノ末端に、殆どの非受容体型チロシンキナーゼの特徴であるSH2もSH3も存在しない。しかしながら、この領域の広範な相同性がJakファミリーメンバー間にあり、多数のホモロジー領域が決定されている(ハーバー、A. G. ら、Oncogene 7:1347-1353(1992))。

【0013】Jakファミリーキナーゼの1メンバーとインターフェロンアルファ(IGN α)のシグナル形質導入との関連が近年報告された(ベラスケス、L. ら、Cell 70:313-322(1992); フ、X. Y., Cell 70:323-335(1992); シンドラー、C. ら、Science 257:809-813(1992))。遺伝子的手法を用い、IFN α に応答しない突然変異ヒト細胞系のIFN α の細胞応答を機能的に再構成する能力でTyk2遺伝子をクローニングした。Tyk2と、あるいはJakキナーゼファミリーの他のメンバーとIFN α 以外のいかなる他のサイトカインのシグナル形質導入との関連は報告されていない。

【0014】発明の概要

本発明は部分的に、いくつかのサイトカイン特にサイトカイン受容体スーパーファミリーのメンバーに結合することによって機能するサイトカインに対する細胞性応答がJakキナーゼファミリーのメンバーの活性化(リン酸化)により媒介されるという知見に基づいている。本発明によれば、Jakキナーゼはサイトカイン活性をサイトカイン受容体結合に呼応したそのチロシンリン酸化

(活性化)を通じて媒介する。本発明は部分的にその作用がJ a k キナーゼの活性化により媒介されるサイトカインを調節する新規な方法に関する。本発明は、その作用がJ a k 2 キナーゼ活性の活性化により媒介されるサイトカインへの細胞応答を阻害する方法を供するものである。また、本発明は、その作用がJ a k キナーゼの活性化により媒介されるサイトカイン、たとえば真核細胞の過剰増殖を誘導するサイトカインへの過剰反応によりおこる病的症状の治療方法に供するものである。さらに、本発明はその作用がJ a k キナーゼの活性化により媒介されるサイトカインへの真核細胞の生物学的反応を阻害することできる組成物の同定方法を提供する。また、その作用がJ a k 2 キナーゼ活性の活性化により媒介されるサイトカインへ真核細胞の生物学的反応を強化する方法を提供する。さらには、本発明は、特殊なJ a k タンパク質をそのキナーゼ活性に干渉されることなく検出し抽出するのに有用な抗体を提供する。

【0015】本発明によれば、その作用がJ a k 2 キナーゼにより媒介される特殊なサイトカインが同定され、そのサイトカインとしてはインターロイキン3 (I L - 3)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F)、エリスロポエチン(E p o)、顆粒球コロニー刺激因子(G - C S F)、インターフェロンガンマ(I F N - γ)、プロラクチンホルモンおよび成長ホルモンがあげられる。本発明はまたJ a k 2 キナーゼの完全なDNAとアミノ酸配列の解明に基づく。従って、本発明は全J a k 2 キナーゼをコードする遺伝子配列、全長のJ a k 2 キナーゼを発現することのできる遺伝子発現を含む発現ビヒクルおよびそれにより形質転換された宿主細胞を提供するものである。

【0016】以下に本明細書に添付の図面について簡単に説明する。

図1-3: マウスJ a k 2 cDNA配列

J a k 2 読み取り枠とフランキング非コード領域のヌクレオチド配列を示す(配列番号: 8)。1文字アミノ酸配列は下に示す(配列番号: 9)。公開された部分的J a k 2 cDNA配列(ハーバー, A. G., ら, *Oncogene* 7: 1347-1353 (1992))からのヌクレオチドとアミノ酸配列情報を上部に示し、下部にはその情報が異なっている配列を示す。ATGコードンは*で示す。ヌクレオチド522の上部の矢印(>)は報告されているJ a k 2 配列の5'末端を示す。ヌクレオチド位置2226にある矢印(^)は先の研究で発見された7アミノ酸挿入の位置を示す(ハーバー, A. G., ら, *Oncogene* 7: 1347-1353 (1992))。3'非コード領域中の括弧内のヌクレオチドは先の研究(ハーバー, A. G., ら, *Oncogene* 7: 1347-1353 (1992))で存在し、本研究では検出できなかった。

【0017】図4-7: ヒトJ a k 1アミノ酸配列とそ

れをコードするDNA

ヒトJ a k 1キナーゼの公開されたアミノ酸(配列番号: 11)とそれをコードするDNA(配列番号: 10)を示す(ウィルクス, A. F. ら, *Mol. Cell Biol.* 11: 2057-2065 (1991))。ヌクレオチド番号は公開された配列のものをを用い、ヌクレオチド76から始まりヌクレオチド3504で終了する。

【0018】図8-12: ヒトTyk2アミノ酸配列とそれをコードするDNA

ヒトTyk2キナーゼの公開されたアミノ酸(配列番号: 13)とそれをコードするDNA(配列番号: 12)を示す(ファームバツハークラフト, I. ら, *Oncogene* 5: 1329-1336 (1990))。ヌクレオチド番号は、公開された配列のものをを用い、ヌクレオチド307から始まりヌクレオチド3867で終了する。

【0019】図13: I L - 3刺激活性化(賦活)による免疫沈降物中のJ a k 2インビトロキナーゼ活性の活性化

DA-3細胞を成長因子から分離し、原料と方法の項で述べたようにI L - 3で10分間賦活(+)したものと、全く賦活しない(-)ものを調製した。ついで細胞抽出物を正常ウサギ血清(NRS)または競合ペプチドの非存在下(α J a k 2)、抗血清が生じるペプチド($30 \mu\text{g}/\text{ml}$)の存在下(α J a k 2+J a k 1ペプチド)、あるいはJ a k 1の相当領域に対応するペプチドの1当量存在下(α J a k 2+J a k 1ペプチド)J a k 2特異的抗ペプチド抗血清で免疫沈降に供した。原料と方法の項で述べたように免疫沈降物をインビトロキナーゼ測定に用いた(実施例1)。反応生成物をSDS-PAGEで分解し、ニトロセルロースに移し、自動放射能測定(上パネル)で検出した。プロットは次いでJ a k 2に対する抗血清(下パネル)で検出した。

【0020】図14-17: J a k キナーゼアミノ酸配列の比較

インテリゲネティックスコンピュータープログラム「Pileup」を用いて発生した、J a k 1(1行目; 配列番号: 14)、Tyk2(2行目; 配列番号: 13)およびJ a k 2(3行目; 配列番号: 9)および共通配列(4行目)のアミノ酸配列を示す[多重度(Plurality)=2.00; 閾値(Threshold)=1.0; Aveウエイト=1.00; Aveマッチ=0.54; Av mismatches=-0.4]。本発明はサイトカインへの細胞性応答を調節する新規の方法に関する。本方法は本発明により明らかにされたいくつかのサイトカインに対する細胞性応答におけるJ a k キナーゼファミリーの一般的役割に基づく。「サイトカイン」とは、細胞から分泌され他の細胞の機能に影響を与えるポリペプチドを意味し、例えばペプチドホルモンや成長ホ

ルモン他があげられる。「サイトカインに対する細胞応答」や「サイトカイン活性」とは、真核細胞や細胞受容体を持った特殊なサイトカインの集合に起因し、典型的に細胞内に遺伝子発現修飾を含む細胞集団に対する一般的生物学的影響を言う。本発明はJ a kキナーゼの活性化により媒介されるサイトカイン作用に関する。その作用としては、例えば、インターロイキン3 (I L-3) に応じた造血前駆細胞の増殖と分化、エリスロポエチン (E p o) に応じた赤芽系細胞の増殖と分化、成長ホルモン (G H) に応じた体細胞増殖等があげられるが、それに限定されるものではない。本発明の方法は、その作用がJ a k 1、J a k 2およびT y k 2を含むJ a kキナーゼファミリーのメンバーで媒介されるいずれのサイトカインにも応用できる。このタイプのサイトカインとしては、サイトカイン受容体スーパーファミリーに属するメンバーに結合することによって機能するものかあられ、またチロシンキナーゼスーパーファミリーに属するメンバーに結合することにより機能するものも含まれる。さらに詳しくは、これらのサイトカインとしては、インターロイキン3 (I L-3)、顆粒球マクローファージコロニー刺激因子 (G M-C S F)、エリスロポエチン (E p o)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F)、インターロイキンガンマ (I F N-γ)、プロラクチンホルモンおよび成長ホルモンがあげられるが、それらに限定されるものではない。本発明によれば、J a kキナーゼはサイトカイン受容体結合に応答して、チロシンリン酸化 (活性化) を通じてサイトカイン作用を媒介する。よって、本発明によって供される調節方法に適切なサイトカインは、J a kキナーゼファミリーの1あるいはそれ以上のメンバーのチロシンリン酸化 (活性化) を起こす能力を基ついで同定することができる。サイトカイン刺激に続く細胞内でのJ a kキナーゼのチロシンリン酸化は、例えば、抗リン酸チロシンモノクロナル抗体を結合する能力を測定することによって、検出できる。つまり、チロシンリン酸化J a kキナーゼのみがこのタイプの抗体と結合するからであろう。また、後述のインビトロキナーゼ測定はサイトカイン賦活後の細胞におけるJ a kキナーゼの活性化 (リン酸化) 状態を決定するのに用いられる。

J a kキナーゼ依存性サイトカイン活性の阻害方法

本発明によれば、サイトカイン活性は細胞に及ぼすサイトカイン作用を媒介するJ a kキナーゼの活性を阻害することにより阻害される。本発明の範囲内でのJ a kキナーゼ活性を阻害する方法として、J a k遺伝子発現を阻害することがある。J a kキナーゼの発現はアンチセンス分子かあるいはリボザイムを用いて阻害される。アンチセンス分子と遺伝子発現を阻害するためのその使用は、この分野では公知である (例えば、コーエン、J. , Oligodeoxyribonucleotides, Antisense Inhibitors

of Gene Expression, CRC Press (1989); トール, WO92/10590)。J a kキナーゼ発現を阻害するの有用なアンチセンス分子は阻害される該J a kキナーゼのmRNAおよび/またはDNA遺伝子配列に相補的であつそれらと結合できる核酸配列を含む。米国特許第5,190,931号 (イノウエ, M. , 1993年3月2日登録、本明細書を通じて引用) が開示しているように、そのようなアンチセンス分子はアンチセンス分子をコードするDNAを用いる遺伝子発現を通じて細胞に供される。また、本発明のアンチセンス分子は合成的に作られて細胞に供給される。本発明で意図する合成アンチセンス分子は非修飾オリゴヌクレオチドに比してその生理活性が改良された、本分野で公知のオリゴヌクレオチド誘導体である (コーエン, J. , 前述; チュリス, R. H. , 米国特許第5,023,243号、1991年6月11日登録 (本明細書を通じて引用))。

【0021】リボザイムと遺伝子発現を阻害する為のその用途もまた本分野で公知である (例えば、チェッコラ, J. Biol. Chem. 267:17479-17482 (1992); ハンペルら, Biochemistry 28:4929-4933 (1989); ハセロフら, Nature 334:585-591 (1988); エックスティンら, WO92/07065; およびアルトマンら, 米国特許第5,168,053号 (本明細書を通じて引用))。アンチセンス分子のように、リボザイムはその発現を阻害することになる遺伝子のmRNAの相補的標的配列を包む。J a kキナーゼ発現を阻害するのに有用なリボザイムは阻害するJ a kキナーゼのmRNA配列に相補的な標的配列を基本リボザイム構造に組み入れることにより設計される。J a kキナーゼを標的とするリボザイムは市販の試薬 (Applied Biosystems) を用いて合成され、またはそれらをコードするDNAから遺伝子的に発現させ得る。本分野の技術者には自明だが、アンチセンスとリボザイム分子はJ a kキナーゼファミリーの特殊なメンバーを、そのメンバーにとって独特の配列を標的にすることより阻害するように設計される。また、アンチセンスとリボザイム分子は1つ以上のJ a kキナーゼを阻害されるそれらのJ a kメンバーによって共通の配列を標的にすることにより阻害するよう設計される。J a kキナーゼ活性はJ a kタンパク質キナーゼとして機能する能力を阻害する化合物またはペプチドの使用により阻害される。そのような阻害剤としては、薬剤、抗J a kキナーゼ抗体、J a kキナーゼ作動薬または拮抗剤、J a kキナーゼの交差優性突然変異体、およびジーンスタインのようなチロシンキナーゼ活性の一般的な阻害剤があげられるが、これらに限定されるものではない。これらの阻害剤はすべてのJ a kキナーゼに対し一般的阻害効果を示すか、またはJ a kキナーゼファミリーの特殊

なメンバーやサブセットに対してもっと特異的な阻害効果を示す。

【0022】ここで用いる「抗体」とは、実質的には単一集団であるモノクロナル抗体と、不均一集団であるポリクロナル抗体両者をいう。そのような抗体としては、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそのサブクラスを含むすべての免疫グロブリンが含まれる。ここで用いる「抗体」はまた、完全な分子および抗原と結合できるそのフラグメント、例えば、FabやF(ab)₂をも包含する。FabとF(ab')₂フラグメントは完全抗体のFcフラグメントを欠き、循環から素早く除かれ、完全抗体よりさらにもっと非特異的結合組織をもつことができる(ウァールら、J. Nucl. Med. 24:316-325(1983))。そのようなフラグメントは典型的にはパペイン(Fabフラグメントの生産)やペプシン(F(ab')₂フラグメントの生産)のような酵素を用いたタンパク質分割により生産される。Jakキナーゼに対するモノクロナルおよびポリクロナル抗体はこの分野で公知の方法により作られる(例えば、オースベル、F. M. 等、Current Protocols in Molecular Biology, カレントプロトコールズにより出版、11.4.2-11.13.4ページ(1993))。抗体は組換えにより製造されたJakキナーゼタンパク質に対して生成するか、あるいはJakキナーゼが天然に存在する細胞や組織から単離される。抗体は全Jakキナーゼタンパク質に対し生成するか、あるいは好ましくは、サイトカイン誘導チロシンキナーゼ活性に要するJakキナーゼタンパク質の官能ドメインを示すペプチドサブフラグメントに対して生成する。特に特殊なJakキナーゼを特異的に阻害する抗体は、そのJakキナーゼに独特なペプチドフラグメントに対して生成することができる。また、Jakキナーゼファミリーの1つ以上のメンバーを一般的に阻害する為の抗体は、阻害されるJakキナーゼで共通しているペプチドフラグメントに対して生成する。

【0023】Jakキナーゼ活性を阻害する本発明の他の方法は、Jakキナーゼのサイトカイン依存性活性化の阻害剤を使用することである。サイトカイン賦活に先立って、細胞Jakキナーゼは非活性化状態で存在する。Jakキナーゼ活性化の阻害剤は、Jakキナーゼをその触媒的活性状態に転化するのを阻害する能力により同定でき、これは後述のインビトロキナーゼ測定(検定)と実施例により検出できる。本発明者によれば、Jakキナーゼはそのサイトカイン誘導チロシンリン酸化により活性化される。従って、阻害剤としては、本発明によれば、Jakキナーゼのサイトカイン誘導チロシンリン酸化を遮断するかあるいはその触媒的活性な形まで有意に引き下げよう化合物またはペプチドがあげられる。サイトカイン賦活後、Jakキナーゼのチロシン

リン酸化の状態は、例えば、抗リン酸チロシンモノクロナル抗体で検出されるJakキナーゼの能力により測定される。

【0024】特殊なサイトカインによるJakキナーゼの活性化は、Jakキナーゼのサイトカイン受容体との物理的結合を必要とする(実施例2参照)。本発明によれば、Jakキナーゼやサイトカイン受容体のその結合に関する部分を模写するペプチド拮抗剤はJakキナーゼ活性化の阻害剤として有用である。これらのペプチドは本発明によりサイトカイン受容体(Jakキナーゼペプチド用)やJakキナーゼ(サイトカイン受容体ペプチド用)と結合し、Jakキナーゼのサイトカイン受容体との結合を遮断することにより阻害剤として作用するとされている。特に、本発明によれば、EpoによるJak2活性化はJak2とEpo受容体(EpoR)の結合を要し、またこの結合はマイトジェニシスに必須のEpoRの膜近位領域を要する。本発明によれば、この膜近位領域を模写し、EpoR-Jak2相互反応を遮断するペプチド拮抗剤はEpoによるJak2活性化の阻害剤として有用である。

【0025】Jakキナーゼ活性阻害の測定

本発明はまた上記の方法に有用なJakキナーゼ活性の阻害剤を同定するスクリーニング方法を提供する。Jakチロシンキナーゼ活性はインビトロで触媒的活性Jakキナーゼ、Jakリン酸化基質およびATPを、例えば³²Pのように放射能標識で検出可能なように標識したγ位でリン酸化化合物と結合することにより測定できる。この測定では、Jakキナーゼは標識したリン酸化化合物のATPから基質への転移を触媒し、Jakキナーゼ活性は検出可能に標識したリン酸化化合物(標識基質)を含む基質の生成により検出できる。Jakキナーゼ活性の阻害剤は、その測定に用いた時に、標識基質の生成を有意に減少するかあるいは全く除いてしまう化合物やペプチドとして同定される。この測定に使用する触媒的活性Jakキナーゼは種々の原料から得られる。好ましくは、高レベルでJakキナーゼを発現するバキュロウイルスベクターと形質転換された昆虫細胞から触媒的活性Jakキナーゼが得られる。この方法で得られるJak2キナーゼは触媒的に活性でありインビトロキナーゼ測定に有用であることが判明している。同様の方法で昆虫細胞中に大量に生成された他のJakキナーゼくもまた触媒的に活性であろう。

【0026】触媒的活性JakキナーゼはJakキナーゼの構成的活性化を起こす突然変異を持つ細胞からも得られる。例えば、R¹⁹⁹→Cとして知られるEpoR突然変異はEpoRの構成的活性化を起こす(ヨシムラら、Nature 348:647-649(1990))。この突然変異を発現する細胞において、Epoの非存在下、Jak2キナーゼは構成的にチロシンリン酸化され、インビトロキナーゼ活性を保持する。触媒的

に活性な形態の各 J a k キナーゼは、活性化を惹起するサイトカインで賦活された細胞からも得られる。例えば、触媒的活性 J a k 2 キナーゼは E p o、成長ホルモン、I L-3 等で賦活された細胞から得られ、一方触媒的活性な T y k 2 は I F N α で刺激された細胞から得られる。活性を測定する J a k キナーゼのいかなるリン酸化基質もこの測定に使用できる。自己リン酸化活性を持つ J a k キナーゼのための好ましい基質は、J a k キナーゼそのもの、または自己リン酸化部位を含むそのサブフラグメントである。J a k キナーゼのようなチロシンキナーゼは自動リン酸化活性を持つ傾向にある（例えば、ハンクス、S. K. ら、Science 241: 45-52 (1988)）。さらには、J a k 2 の自己リン酸化活性は確立されており、自己リン酸化部位は J a k 2 のアミノ酸 1000-1015 を含有するペプチドフラグメント上に位置することが知られている（図 1-4 参照、配列は V L P Q D K E Y Y K V K E P G (配列番号: 2)）。同様なペプチドフラグメントが J a k 1 タンパク質中のアミノ酸 1015-1029 (図 4-7 参照、配列は A I E T D K E Y Y I V K D D R (配列番号: 3)) と、T y k 2 タンパク質のアミノ酸 1047-1061 (図 8-12 参照、配列は A V P E G H E Y Y R V R E D G (配列番号: 4)) に存在する。J a k キナーゼ間の構造的および機能的相溶性、および一般的なチロシンキナーゼ間の機能的相溶性に基づいて、J a k キナーゼファミリーの他のメンバーもまた自己リン酸化活性を持つものと考えられる。

【0027】本発明は J a k キナーゼのサイトカイン誘導活性化の阻害剤の測定法も提供する。J a k キナーゼのサイトカイン誘導活性化は、サイトカイン誘導後、細胞より J a k キナーゼ抽出物を調製し、インビトロでキナーゼ活性を測定して測定する。J a k キナーゼのサイトカイン誘導活性化の阻害剤は、サイトカイン誘導の前および/またはその間に細胞中に存在し、サイトカイン誘導前の細胞から調製した J a k キナーゼ抽出物中に検知されたインビトロキナーゼ活性を有意に減少させるか全く除くかする化合物かペプチドとして同定される。

【0028】本発明はまたサイトカイン誘導 J a k キナーゼ活性化の潜在的阻害剤である J a k キナーゼサイトカイン受容体相互反応の阻害剤の測定方法をも提供する。活性化 J a k キナーゼでリン酸化されたサイトカイン受容体には、J a k キナーゼサイトカイン受容体相互反応は、上記のインビトロキナーゼ測定を用いサイトカイン受容体をリン酸化反応基質として測定に組み入れることにより測定できる。例えば、エリスロポエチン受容体 (E p o R) の J a k 2 キナーゼによるリン酸化はその測定法を用いて測定できる。J a k キナーゼサイトカイン受容体相互反応の阻害剤はこの測定法に組み入れられた時にリン酸化 (標識) サイトカイン受容体タンパク質の生成を有意に減少させるか、または完全に除去する

化合物かペプチドとして同定される。この測定法に用いるサイトカイン受容体タンパク質は好ましくは、ここで述べるように J a k キナーゼの生産に適した組換え宿主細胞から生産し精製して得られる。好ましい宿主細胞としては高レベルでサイトカイン受容体を発現し得るバキュロウイルスベクターと形質転換した昆虫細胞である。あるいは、サイトカイン受容体タンパク質は天然資源より単離できる。

【0029】J a k キナーゼ依存性サイトカイン活性の増強方法

細胞のサイトカインに対する生理的応答が J a k キナーゼの不十分な量のために不足している場合において、本発明は細胞中の J a k キナーゼのレベルを増加することによってその応答を増強する方法を提供する (実施例 4)。この状態は細胞により生産される J a k キナーゼの量をサブノーマルなレベルまで減少させる突然変異によるものかも知れない。この状態は、サイトカイン誘導 J a k 活性化の割合あるいは程度を、細胞から生産された J a k キナーゼのレベルをサイトカイン誘導後の減少させ細胞により製造される J a k キナーゼレベルがサイトカイン誘導後の活性 J a k キナーゼの十分なレベルに達しない程に減少させる突然変異によるものかも知れない。J a k キナーゼレベルは J a k キナーゼタンパク質を細胞に加えることで、または J a k キナーゼを発現できる細胞にベクターを導入することにより、増加できる。J a k 2 発現のためのベクターおよび方法は以下に述べる。この分野の技術者にとってはあきらかであるが、これらの方法は J a k キナーゼファミリーの他のメンバーの生産および発現にも適用できるものである。

【0030】サイトカイン活性調節方法の臨床的応用

本発明によれば、上記の J a k キナーゼ活性調節方法は、その作用が J a k キナーゼ活性により媒介されるサイトカインに対する異常な細胞性応答により起こる病的症状の治療に適用できる。その作用が J a k キナーゼ活性により媒介されるサイトカインへの過剰な細胞性応答により起こるそのような病的状態は、J a k キナーゼ活性を阻害することにより治療できる。特に、真核細胞の過剰増殖により起こる病的症状は、その作用が J a k キナーゼ活性により媒介されるサイトカインに呼応してその過剰増殖が起こる J a k キナーゼ活性を阻害することにより、治療できる。そのような病的症状は遺伝子的突然変異または自然発生突然変異により起こる。例えば、赤血球増加症 (エリスロサイトシス) は赤血球の前駆体細胞からの過剰増殖を含む遺伝子病である。この過剰生産はエリスロポエチン (E p o) に関係し、E p o-E p o R 結合の J a k 2 キナーゼ活性の調節異常となる E p o 受容体 (E p o R) 内での突然変異によるものである。同等の突然変異もまた自然発生し得、その病的症状を引き起こす。さらには、類似の病的症状も J a k キナーゼ媒介サイトカイン応答で調節される他の細胞系に起

こり得る。また、その作用がJ a kキナーゼ活性により媒介されているサイトカインに対する細胞応答不足や細胞無応答により起こる病的症状は、J a kキナーゼ活性を強化することにより治療できる。

【0031】ここで述べるJ a kキナーゼ活性を阻害できる組成物、例えばアンチセンス分子、リボザイム、J a k抗体、拮抗剤等の投与は、この分野の技術者に公知のいかなる方法によってもよい。例えば、非経口投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉投与、腹腔内投与、経皮投与でき、また、薬理学的に許容できる担体と共にこの分野での技術者に公知のいかなる方法でも投与できる。通常薬理学的に許容できるビヒクルと共に阻害組成物の効果を示す量を投与する。効果のある阻害組成物量は種々の条件、例えば治療される病状およびその程度、患者の性別、体重、また投与方法、投与頻度、阻害組成物の力値、また阻害組成物の力値に影響を及ぼす薬理学的に許容できるビヒクル中の組成物の存在等考慮して、熟練した専門家により決定される。

【0032】キナーゼ活性に妨害されることなく特異的J a kタンパク質に結合できる抗体

本発明は真核細胞からそのキナーゼ活性に妨害されることなく特異的にJ a kキナーゼを検出し抽出する為に有用な抗体を提供するものである。これらの抗体は各J a kキナーゼで異なるドメイン1と2の間のJ a kヒンジ部を示すペプチドフラグメントに対し生成する。そのような抗体を生成するのに有用なペプチドはJ a k2のアミノ酸758-776 (図1-3、配列はDSQRKLQFYEDKHQLPAPK (配列番号: 5))、J a k1のアミノ酸786-801 (図4-7、配列はTLIEKERFYESRCRPVTPS (配列番号: 7))に由来する。本発明によれば、これらのペプチドに対して生成した抗体はペプチド抗原が由来したJ a kタンパク質をキナーゼ活性に妨害されることなく特異的に結合した認識できる。標準免疫沈降法を用いて、これらの抗体はインビトロキナーゼ測定に用いることのできる特異的なJ a kタンパク質を含有する細胞抽出物を得るために使用できる。そのような使用は、実施例1-3および5でJ a k2キナーゼのヒンジ部に対し生成した抗体を用いて説明する。

【0033】J a k2遺伝子とタンパク質

本発明に従って、マウスJ a k2キナーゼの完全c DNA配列およびアミノ酸配列が提供される。J a k2c DNA全長のヌクレオチド配列が図1-3に示され (配列番号8)、これは、1129アミノ酸長さであり、分子量の計算値が130kDaであるJ a k2タンパク質をコードする3387bpの転写読取枠 (ORF) を含んでいる。図1-3におけるJ a k2c DNAの5'末端には第1のATGの前に3個の停止コドンが存在する。第1のATGはコザック (Kozak) 共通フランキング配列を満たしていないが、典型的な翻訳開始環境においてA

TGコドンが直ちに後続する [コザック, Mの「NucL. Acids Res.」15: 8125~8148 (1987)]。5'末端は明確なシグナルペプチドを含まない。J a k2クローンの3'非翻訳領域の編集された大きさは、4.4kbの転写に対応する0.9kbである。

【0034】J a k2キナーゼを遺伝子的に設計する方法は、本発明に従って、J a k2キナーゼをコードするDNAのクローニングおよびこれらの配列の発現を通じて容易になる。J a k2キナーゼをコードするDNAは、本発明に従う各種の源、すなわちゲノムDNA、c DNA、合成DNAおよびこれらの組み合わせから誘導されてもよい。ゲノムDNAは天然に生じるイントロンを含んでも含まなくてもよい。そのうえ、このようなゲノムDNAは、J a k2遺伝子配列の5'プロモーター領域と関連して得られる。5'プロモーター領域は、発現シグナルがこのプロモーター領域に存在すると認められるそれらの宿主細胞に保有され、J a k2の発現に用いられる。

【0035】イントロンを含まないゲノムDNAまたはc DNAは種々の方法で得てもよい。当業者に公知の手段によって、ゲノムDNAを適当な細胞から抽出し、精製することができる。別法として、当業者に公知の手段によって、メッセンジャーRNA (mRNA) をJ a k2キナーゼを生産する細胞から単離し、c DNAの製造に用いてもよい。このような適当なDNA調製品を酵素的に開裂するかまたはランダムにせん断し、組換えベクターに連結して、ゲノムDNAまたはc DNA配列ライブラリーのいずれかを形成する [アウスベル, F. M. らの「Current Protocols in Molecular Biology」, カレント・プロトコル発行, 5. 0. 3~5. 10. 2 (1993) 参照]。次いで、図1-3に示されるJ a k2遺伝子配列 (配列番号8) に基づく核酸プローブとのハイブリダイゼーションのためにこれらのライブラリーをスクリーニングし、配列をコードするクローニングJ a k2を同定し、単離することができる [アウスベル, F. M. らの前記文献の6. 0. 3~6. 6. 1 参照]。次いで、このスクリーニングによって同定されるライブラリーのメンバーを分析して、それらに含まれるJ a k2配列の大きさと性質を決定する。

【0036】上述の組換え法の代わりに、当業者に公知の方法に従って、J a k2キナーゼをコードする遺伝子配列を合成的に製造することができる [アウスベル, F. M. らの前記文献の2. 11. 1~2. 11. 18 参照]。上述の方法で得られた配列をコードするクローニングJ a k2を、発現ベクターに作動可能に連結し、細菌細胞または真核細胞に導入して、J a k2キナーゼを生産してもよい。このような操作技術は当業者に公知であり、アウスベル, F. M. らの前記文献の3. 0. 3~3. 16. 11に記載されている。

【0037】DNAは、もしそれが転写制御情報と翻訳制御情報を含んだヌクレオチド配列を含むならば、ポリペプチドを発現可能であると言われており、そのような配列は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結する。作動可能な連結とは、制御DNA配列と発現されようとするDNAコーディング配列が、コーディング配列の発現を可能にするような方法で結合する連結である。遺伝子発現に必要な制御領域の正確な性質は有機物によって多様であるが、一般的に原核生物においては、プロモーター（RNA転写の開始を支配する）およびRNAに転写されるときにコーディング配列の翻訳の開始のシグナルとなるDNA配列の両方を含んでいるプロモーター領域を含む。このような領域は通常、転写と翻訳の開始にかかわる、TATAボックス、キャップ配列、CAAT配列などの5'非コーディング配列を含む。

【0038】要すれば、Jak2をコードする遺伝子配列のための非コーディング領域3'を、上述の方法で得てもよい。この領域は、転写終結やポリアデニル化シグナルなどの、その制御配列のために保有される。したがって、Jak2キナーゼをコードするDNA配列に本来隣接する3'領域の保有によって、これらの制御領域が提供される。発現宿主細胞において制御シグナルが十分に機能しない場所に、次いで宿主細胞において機能する3'領域が置換される。

【0039】原核細胞（たとえば、E. コリ、B. サブチリス、シュードモナス、ストレプトミセスなど）においてJak2キナーゼを発現するために、Jak2キナーゼをコードする配列を機能原核生物プロモーターに作動可能に連結することが必要である。このようなプロモーターは構成的であるかまたは、好ましくは制御可能（すなわち、誘導可能あるいは抑圧解除可能）である。構成的プロモーターの例としては、バクテリオファージλのintプロモーター、pBR322のβラクタマーゼ遺伝子配列のblaプロモーターおよびpPR325のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列のCATプロモーターなどが挙げられる。制御可能原核生物プロモーターの例としては、バクテリオファージλのメジャーライトおよびレフトプロモーター（PlおよびPr）、E. コリのtrp、recA、lacZ、lacIおよびgalプロモーター、B. サブチリスのα-アミラーゼ【ウルマネン、I.らの「J. Bacteriol.」, 162: 176~182 (1985)】およびo-28-特異プロモーター【ギルマン、M.Z.らの「Gene sequence」, 324: 11~20 (1984)】、バシラスのバクテリオファージのプロモーター【グリザン、T. J.の「The Molecular Biology of the Bacilli」, アカデミック・プレス・インコーポレイテッド、NY (1982)】およびストレプトミセスのプロモーター【ウォード、J.M.らの「Mol. Gen. Genet.」, 203: 468~

478 (1986)】が挙げられる。原核生物プロモーターは、グリック、B.R.の「J. Ind. Microbiol.」, 1: 277~282 (1987)；セナティエンボ、Y.の「Biochimie」, 68: 505~516 (1986)；およびゴッテマン、S.の「Ann. Rev. Genet.」, 18: 415~442 (1984)に記載がある。

【0040】原核細胞に固有の発現も、遺伝子配列をコードする配列の上流にリボソーム結合部位の存在を要求する。このようなリボソーム結合部位は、たとえば、ゴールド、L.らの「Ann. Rev. Microbiol.」, 35: 365~404 (1981)に記載されている。好ましい真核生物宿主は、酵母、菌類、昆虫細胞、インビボまたは組織培養による哺乳類細胞である。宿主として使用し得る哺乳類細胞は、COS細胞および繊維芽細胞、骨髄白血球または造血組織から誘導される細胞またはセルラインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0041】哺乳類宿主にとって、数種の可能なベクター系がJak2キナーゼの発現に有用である。宿主の性質に応じて、非常に多種の転写および翻訳制御配列が使用される。転写および翻訳制御シグナルは、制御シグナルが高レベルの発現を有する特定の遺伝子配列に結合するアデノウイルス、ウシパピローマウイルス、シミアンウイルスなどのウイルス源から誘導される。別法として、アクチン、コラーゲン、ミオシンなどの哺乳類の発現産物からのプロモーターを使用してもよい。抑制または活性化させる転写開始制御シグナルが選択され、そのため遺伝子配列の発現を調節しうる。興味深いのは、温度の変化によって発現が抑制または開始されるために温度感応性である制御シグナル、あるいは化学的（代謝など）制御に従属する制御シグナルである。

【0042】触媒的に活性なJak2キナーゼの生産に用いるのに好ましい宿主は、ショウジョウバエの幼虫などの昆虫細胞である。宿主として昆虫細胞を使用するとき、ショウジョウバエアルコール脱水素酵素プロモーターを使用できる【ルビン、G.M.の「サイエンス」, 240: 1453~1459 (1988)】。別法として、バキュロウイルスベクターを処理して、昆虫細胞中に大量のJak2キナーゼを発現できる【たとえば、アウスベルらの「Current Protocols in Molecular Biology」, カレント・プロトコル発行、16. 8. 1~16. 11. 7 (1993)；ジャスニー、B.R.の「サイエンス」, 238: 1653 (1987)；ミラー、D.W.らの「Genetic Engineering」(1986)；セトロウ、J. K.らの「eds., Plenum」, Vol. 8, 277~297参照】。バキュロウイルスベクターからの昆虫細胞におけるJak2キナーゼの発現によって、上述のJak2キナーゼ活性のインヒビター用のスクリーニングアッセイに用いられる活性化Jak2キナーゼが生産される。

【0043】これまで論じてきたように、真核生物宿主におけるJak2キナーゼの発現には、真核生物の制御

領域の使用が要求される。このような領域は一般に、RNA合成の開始を支配するに十分なプロモーター領域を含んでいる。好ましい真核プロモーターは、マウスメタロチオネインI遺伝子配列[ハマー, D. らの「J. Mol. Appl. Gen.」, 1: 273~288 (1982)]; ヘルペスウイルスのTKプロモーター[マックナイト, S. の「Cell」31: 355~365 (1982)]; SV40初期プロモーター[ベノイスト, C. らの「Nature(ロンドン)」290: 304~310 (1981)]; 酵母gal4遺伝子配列プロモーター[ジョンストン, S. A. らの「Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)」79: 6971~6975 (1982)]; シルバー, P. A. らの「Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)」81: 5951~5955 (1984); および9-27遺伝子プロモーター[レイド, L. E. らの「Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)」86: 840~844 (1989)]である。

【0044】広く知られているように、真核プロモーターmRNAの翻訳は第1のメチオニンをコードするコドンで開始される。この理由のゆえに、真核プロモーターとJak2キナーゼをコードするDNA配列の間の連結が、メチオニンをコードすることが可能な、どのような介在コドン(AUGなど)も含まないことが確実であることが好ましい。このようなコドンの存在から、融合タンパク質(AUGコドンがJak2キナーゼをコードする配列として、同じリーディングフレーム中に存在する場合)あるいはフレームシフト型突然変異(AUGコドンがJak2キナーゼをコードする配列として同じリーディングフレーム中に存在しない場合)のいずれかが形成される。

【0045】Jak2キナーゼをコードする配列および作動可能に連結したプロモーターは、線状分子または、より好ましくはクローズドコバレント環状分子のいずれかである、非複製DNA(またはRNA)分子の一部として、感受原核あるいは真核細胞のいずれかに導入されてもよい。このような分子は自己複製が不可能であるため、Jak2キナーゼの発現は、導入された配列の過渡発現を通じて起こる。別法として、永久発現は、宿主染色体に導入された配列の組込みを通じて起こる。

【0046】ひとつの具体例として、所望の遺伝子配列を宿主細胞染色体へ組込みが可能なベクターが採用される。染色体へ導入されたDNAを安定して組込んだ細胞は、発現ベクターを含む宿主細胞の選択にかかわる1個以上のマーカーを導入することによっても選択することができる。マーカーは、栄養要求性宿主に原栄養性、生物致死耐性(たとえば抗生物質または銅などの重金属)を与える。選択可能なマーカー遺伝子配列は、発現されるDNA遺伝子発現に直接連結するか、またはコトランスフェクションによって同じ細胞に導入することができる。追加エレメントもまたシグナル鎖結合タンパクmR

NAの光合成に必要とされる。これらのエレメントとしては、スプライスシグナル、転写プロモーター、エンハンサーおよび終結シグナルが挙げられる。これらのエレメントを有するcDNA発現ベクターについて、オカヤマ, H. の「Molec. Cell. Biol.」, 3: 280 (1983)に記載されている。

【0047】好ましい具体例において、導入された配列は、感受宿主において自己複製可能なプラスミドまたはウイルスベクターに組み入れられるだろう。多種多様なベクターのいずれでも、この目的に採用してもよい。特定のプラスミドまたはウイルスベクターの選択における重要性の因子としては、ベクターを含む感受細胞が、ベクターを含まない感受細胞から、確認され、選択されることの容易性; 特定の宿主において要求されるベクターのコピーの数; および異種宿主細胞間でベクターをシャトルすることができることが望ましいかどうか、などが挙げられる。好ましい原核ベクターは、E. コリにおいて複製可能なプラスミド(たとえば、pBR322, ColE1, pSC101, pACYC184, pVX)である。これらのプラスミドについて、たとえば、マニアチス, T. らの「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」, コールド・スプリング・ハーバー・プレス, コールド・スプリング・ハーバー, NY (1982)に記載されている。バシラスプラスミドとしては、pC194, pC221, pT127などが挙げられる。これらのプラスミドについて、グリザン, T. の「The Molecular Biology of the Bacilli」, アカデミック・プレス, NY (1982), 307~329に記載がある。好適なストレプトミセスプラスミドは、pIJ101[ケンダー, K. J. らの「J. Bacteriol.」, 169: 4177~4183 (1987)], およびpC31などのストレプトミセスバクテリオファージ[チャーター, K. F. らの「International Symposium on Actinomycetales Biology」, アカデミック・カイド, ブダペスト, ハンガリー (1986), 45~54]などである。シュドモナスプラスミドについては、ジョン, J. F. らの「Rev. Infect. Dis.」, 8: 693~704 (1986) およびイザキ, K. の「Jpn. J. Bacteriol.」, 33: 729~742 (1978)に記載されている。

【0048】このましい真核プラスミドは、BVP、ワクシニア、SV40、2-ミクロンサークルなど、あるいはそれらの誘導体である。これらのプラスミドは当業者に公知である[ボツテイン, D. らの「Miami Wnter. Symp.」, 19: 265~274 (1982); プローチ, J. R. の「The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance」, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー, コールド・スプリング・ハーバー, NY, 445~470 (1981); プローチ, J. R. の「Cell」, 28: 203~

204 (1982); バルーン, D. P. らの「J. Clin. Hematol. Oncol.」, 10: 39~48 (1980); マニアチス, T. の「Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol3, Gene sequence Expression」, アカデミック・プレス, NY 563~608 (1980)】。

【0049】一旦、構造 (construct) を含むベクターまたはDNA配列が発現を行うと、各種の適当な手段のいずれかによって、DNA構造が適当な宿主細胞へ導入される：すなわち、形質転換、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、直接マイクロインジェクションなどである。ベクターの導入後、感受細胞をベクターを含有する細胞の成長に適するように選ばれた培地において成長させる。クローン化遺伝子配列によって、Jak 2 キナーゼが生産される。本明細書に記載するように、抽出、沈降、免疫沈降、クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの通常の方法を用い、発現されたJak 2 キナーゼを単離、精製することができる。

【0050】

【実施例】

実施例1：マウスJak 2 タンパク質チロシンキナーゼの構成およびそのIL-3シグナル形質導入における役割

要約：インターロイキン3 (IL-3) は、初期前駆細胞および種々の線状分子に委任された細胞などの種々の造血細胞の増殖および分化を制御する。IL-3の受容体は、互いに高親和性の受容体の発現を必要とする α および β サブユニットから構成される。IL-3受容体鎖はサイトカイン受容体ファミリーの一員であり、同定しうるキナーゼ触媒ドメインが欠損している細胞質ドメインを含んでいる。しかし、IL-3の結合は、受容体の β 鎖および幾つかの細胞性タンパク質のチロシンリン酸化を急速に誘発する。IL-3シグナルの形質導入におけるタンパク質チロシンキナーゼのJakファミリーの潜在的役割を調査するために、マウスJak 1 およびJak 2 の全長cDNAクローンを得、予測されたタンパク質に対する抗血清を調製した。Jak 2 に対する抗血清を用い、IL-3の刺激の結果、Jak 2 の急速で特異的なチロシンリン酸化が起こり、インビトロでのキナーゼ活性が活性化されることを説明する。これらの結果は、Jak 2 がIL-3結合にカップリングして、チロシンリン酸化が起こり、最後にIL-3に媒介される生物学的応答が起こるといふ仮説をサポートする。

【0051】序論

造血機能は種々の成長因子とそれらの同種の受容体との相互作用によって制御される [メトカーフ, D. の「Nature」, 339: 27~30 (1989); クラークおよびカーメンの「Science」, 236: 1229~123

7 (1987)]。公知の造血成長因子のうち、インターロイキン3 (IL-3) は初期前駆細胞および幾つかの骨髄線状分子の増殖および分化をサポートする [イーレ, J. N. の「Interleukins: Molecular Biology and Immunology」, キシモト, T 編., カーガー, ベイゼル, 65~106 (1992)]。IL-3の受容体が、IL-3の高親和性結合のために要求される2つのサブユニット、60~70 kDaの α サブユニットと130~140 kDaの β サブユニットから成り立っていることが示されている [ミヤジマ, A. らの「Annu. Rev. Immunol.」, 10: 295~331 (1992)]。 α および β サブユニットは、サイトカイン受容体スーパーファミリーで発見された細胞外に保存された特色を含んでいる。このスーパーファミリーの他のメンバーと同様に、受容体サブユニットの細胞質ドメインは限定された類似性のみを他のサイトカイン受容体と分け持ち、シグナル形質導入メカニズムを示唆するどんな検出可能な触媒的ドメインも欠損している。触媒的ドメインの欠損にもかかわらず、シグナル形質導入がチロシンリン酸化を意味するということが、考慮すべき証拠によって示唆される [メトカーフ, D. の「Nature」, 339: 27~30 (1989); ミヤジマ, A. らの「Annu. Rev. Immunol.」, 10: 295~331 (1992)]。特に、活性化チロシンキナーゼは、IL-3の要求を廃棄することができ、IL-3は幾つかの細胞基質およびIL-3受容体複合体の β サブユニットのチロシンリン酸化を迅速に誘発する。これらの理由のため、受容体に結合し、リガンド結合によって活性化されるタンパク質チロシンキナーゼを同定することに大いなる興味がある。

【0052】シグナル形質導入に包含されるIL-3依存細胞に発現されるタンパク質チロシンキナーゼのスペクトルを同定するために、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) を退行性オリゴヌクレオチドで行い、固定タンパク質チロシンキナーゼドメインとする [ウィルクス, A. F. の「Methods Enzymol.」, 200: 533~546 (1991)]。このアプローチとノーザンブロット分析法を用いて、IL-3依存細胞が示され [マノ, H らの「Oncogene」, 8: 417~424 (1993)]、lyn, Tec, c-fes, Jak 1 および Jak 2 などの多くのタンパク質チロシンキナーゼに対して遺伝子を発現している。シグナル形質導入におけるlynキナーゼの潜在的意味は、免疫沈降法により、IL-3刺激がlynキナーゼの活性を増加しすることを示した過去の研究によって指摘された [トリゴエ, T. らの「Blood」, 80: 617~624 (1992)]。しかし、我々が検査したマウスIL-3依存細胞において、lynキナーゼ活性またはチロシンリン酸化の状態に対するIL-3の効果は検出されない。また、Tecまたはc-fesにおいて、どんなチロシンリン酸化またはキナーゼ活性の活性化も検出されていない。した

がって、我々の努力は、IL-3シグナル形質導入におけるマウスJak1およびJak2遺伝子の役割を評価するための試薬の発展に焦点を絞った。

【0053】Jak (Janusキナーゼ; 別に、just another kinaseを意味するとも言われる) ファミリーのキナーゼは、造血細胞のチロシンキナーゼドメインのPCR増幅において最初に検出された [ウィルクス, A. F. の「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 86: 1603~1607 (1989)]。これらの研究は、主要PCR増幅産物が誘導される、2つの近い関係にある遺伝子 (FD17とFD22; 後にJak2とJak1と名付けられた) を同定した。ヒトJak1遺伝子の完全構造が報告され [ウィルクス, A. F. らの「Mol. Cell. Biol.」, 11: 2057~2065 (1991)]、最近、マウスJak2遺伝子の部分配列が報告された [ハーバー, A. G. らの「Oncogene」, 7: 1347~1353 (1992)]。それらとは別に、c-fms遺伝子からのチロシンキナーゼドメインプローブによる、cDNAライブラリのスクリーニングによって、ファミリーの第3のメンバー (Tyk2) が単離された [フィルムバッハクラフト, I. らの「Oncogene」, 5: 1329~1336 (1990)]。該ファミリーは2つのキナーゼドメインの存在によって特徴付けられ、そのひとつは、タンパク質キナーゼのすべてのホールマークを持つカルボキシルドメインである。第2のドメインは直ちにアミノ末端であり、タンパク質キナーゼのすべてのホールマークを生み出すが、タンパク質チロシンキナーゼとセリン/トレオニンキナーゼの両方とは大きく異なっている。キナーゼドメインに対するアミノ末端には、ほとんどの非受容型チロシンキナーゼを特徴付けるSH2およびSH3ドメインがない。しかし、Jakファミリーのメンバーの中でこの領域には大きな類似性があり、多くの相同ドメインが定められた [ハーバー, A. G. らの「Oncogene」, 7: 1347~1353 (1992)]。

【0054】シグナル形質導入におけるキナーゼのJakファミリーのメンバーの間のつながりは、インターフェロンアルファ (IFN α) に対する細胞質応答を検査する最近の研究において確立された [ベラツケツ, L. らの「Cell」, 70: 313~322 (1992)]。遺伝子的アプローチを用いて、IFN α に非応答性である突然変異ヒト細胞系において、IFN α に対する細胞質応答を機能的に再構成するそれ自身の能力によって、Tyk2遺伝子がクローン化された。IFN α の結合に続いて、Tyk2のキナーゼ活性が活性化され、インターフェロン刺激遺伝子因子3 α (ISGF3 α) 複合体の91/84kDaタンパク質のリン酸化を招くと推測された [フー, X. Y. の「Cell」, 70: 323~335 (1992); シンドラー, C. らの「Science」, 257: 809~813 (1992)]。リン酸化に続く

て、この複合体はISGF3 γ タンパク質と結合し、該複合体は核に移動して、インターフェロン刺激応答エレメントに結合することによって、遺伝子の発現を活性化する。

【0055】エリスロポイエチン (Epo) に対する応答におけるJak2の役割が実施例2に記載されている。記載した研究は、Epo刺激がJak2のチロシンリン酸化を誘発し、そのインビトロでの自己リン酸化活性を活性化することを実証している。EpoRの一連の突然変異体を用い、Jak2チロシンリン酸化の誘発が、生物学的応答の誘発に関係していることが発見された。Jak2は、生物学的活性が要求されるEpo受容体の膜近傍細胞質領域と物質的に関連していることが示された。

【0056】本発明において、マウスJak2遺伝子の完全構造を開示する。Jak2がIL-3に対する応答において迅速にチロシンリン酸化され、それに関連して、そのインビトロな自己リン酸化活性の活性化が行われることを実証する。結果的にJak2が、チロシンリン酸化のため、および最終的に生物学的応答のためのIL-3刺激にカップリングするチロシンキナーゼであるという証拠がえられた。さらに、IL-3とEpoの両方に対する応答におけるJak2の関係は、Jak2あるいはファミリーのメンバーが、各種の造血成長因子受容体のマイトジェンシグナリング経路であることが示唆される。

【0057】材料および方法

マウスJak2クローンの単離: 前述したように、固定ドメインに対応する退行性オリゴヌクレオチドのポリメラーゼ鎖反応 (PCR) を使用して、単球由来のマウス骨髄からのcDNAを増幅した [ウィルクス, A. F. の「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 86: 1603~1607 (1989)]。Jak2cDNAクローンをランダムプライミングによって³²Pで標識し、マウス単球およびIL-3依存骨髄NF558およびDA3細胞ファージcDNAライブラリのスクリーニングに使用した [イーおよびウイelmanの「Oncogene」, 4: 1081~1087 (1989); モリシタ, K. らの「Cell」, 54: 831~840 (1988); パーソロミューおよびイーの「Mol. Cell. Biol.」, 11: 1820~1828 (1991)]。単離したcDNAフラグメントをクローン化して、pブルースクリプトベクターにし、制限酵素地図作製とシーケンシングによって分析した。サブシーケントファージライブラリスクリーニングは最も5'Jak2cDNAフラグメントで行った。最長のcDNAはサブクローン化してpブルースクリプトベクターとし、ジデオキシ鎖終結法でヌクレオチド配列を決定した [サンガー, F. らの「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 74: 5463~5467 (1977)]。

【0058】ノーザン分析：前述したように、全細胞RNAとポリ(A)+RNAをマウス組織および細胞系から単離した【クリーブランド, J. L. らの「Mol. Cell. Biol.」, 9: 5685~5695 (1989)】。約20μgの全RNAと4μgのポリ(A)+RNAを1.0%アガロース/ホルムアルデヒドゲル上で分離し、ニトロセルロースフィルターに移す。フィルターを、Jak2の5'から誘導した、³²Pで標識したランダムにプライムされた800bpのcDNAフラグメントとハイブリダイズした。オートラジオグラフィー後、フィルターをストリップしてβ-アクトチンでプローブした。

【0059】細胞および細胞培養：これらの研究に用いた細胞系の特性が文献に記載されている【イーレおよびアスキューの「Int. J. Cell. Cloning」, 1: 1~30 (1989)】。IL-3依存細胞のために10%胎児コウシ血清(FCS)とマウスIL-3(25U/ml)を追加したRPMI中に細胞を維持した。単球由来のマウス骨髓を前述のように成長させた【イーおよびウイelmanの「Oncogene」, 4: 1081~1087 (1989)】。

【0060】コンピューター分析：DNAデータとタンパク質データベースをジェネティクス・コンピューター・グループの配列分析ソフトウェアで調査した。スイスプロットとゲンバンクデータベースをFASTAとTFASTAプログラムで調査した。

【0061】抗体の生産：Jak2タンパク質のN-末端部分(アミノ酸19~31)およびドメイン1と2の間のヒンジ領域(アミノ酸758~776(配列番号5))に対応する合成ペプチドを、MESカップリング法でキーホールリンペットのヘモシアニンに結合し、ラビットの免疫感作に使用した。類似のJak1のヒンジ領域(アミノ酸786~804(配列番号6))に対応する合成ペプチドを同様に調製し、競合研究に使用した。Jak2抗体または抗ペプチド抗体に関して、あるいはJak2抗体に係る処理に関して、他に特別の指示がない限り、はヒンジ領域(アミノ酸778~776(配列番号5))に対して生産された抗体を意味する。

【0062】インビトロにおける翻訳および転写：全長Jak1またはJak2 cDNAをpBSK(ストラタジーン)に挿入し、すでに存在するプロトコルに準じてT3 RNAで転写するのに使用した。³⁵Sトランスラベル(NEN)の存在下、約3μgのRNAを翻訳反応に使用した(ストラタジーン)。生成物を等量に分割し、処理なしでSDS-PAGEに付すかまたはJak1またはJak2抗血清で免疫沈降に付した。免疫沈降に使用する前に、ペプチド(100μg/ml)を抗血清とともに4℃で1時間インキュベートすることにより、ペプチド競合を行った。

【0063】インビトロにおけるキナーゼアッセイ：プロテインA-セファロース(ファルマシア)上に免疫沈

降されたタンパク質をキナーゼバッファー(50mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 0.1mM Na₂VO₄, 10mM HEPES, pH7.4)にて洗浄し、続いて、0.25mCi/ml ³²P-γ-ATPを含有する同量のキナーゼバッファーとともに、室温で30分間インキュベートした。十分に洗浄した後、タンパク質をSDS-PAGEのためにサンプルバッファーに溶解し、7%ゲルに分離した。³²P含有タンパク質をオートラジオグラフィーにて可視化した。インビトロリン酸化Jak2をゲルスライスから単離し、文献記載の操作でホスホアミノ酸含量を定量した【クーパー, J. A. らの「Methods Enzymol」, 99: 387~402 (1983)】。

【0064】結果

造血成長因子依存細胞に発現したタンパク質チロシンキナーゼのスペクトルを、チロシンキナーゼドメインの固定領域に対応する退行性オリゴヌクレオチドを用いる逆転写酵素/ポリメラーゼ鎖反応(RT/PCR)によって同定した【ウイルクス, A. F. の「Methods Enzymol」, 200: 533~546 (1991)】。最も頻繁に単離されたcDNAクローンのひとつは、クローンFD17(Jak2と改名された)と同一であることがわかった【ウイルクス, A. F. の「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 86: 1603~1607 (1989)】。

【0065】初期の発現分析は、造血細胞にJak2が豊富に広範囲に発現したことを指摘し、機能の研究用の全長cDNAクローンを得ることを我々に思い付かせた。マウス骨髓cDNAライブラリのスクリーニングから、幾つかのオーバーラップクローンが単離され、そのクローンの最長のもの(4kb)はJak2の完全コーディング領域を含んでいた。Jak2のヌクレオチド配列は、3387bpの転写解釈枠(ORF)を含み、5'末端は第1のATGの前に3つの停止コドンを含んでいる(図1-3)。第1のATGはコザック共通フランキンク配列を満たしていないが、典型的な翻訳開始環境においてATGコドンが直ちに後続する【コザック, Mの「Nucl. Acids Res.」15: 8125~8148 (1987)】。5'末端は明確なシグナルペプチドを含まない。Jak2クローンの3'非翻訳領域の編集された大きさは、4.4kbの転写に対応する0.9kbである。ひとつのcDNAクローンはヌクレオチド3271で分岐し、1.4kbの3'非翻訳領域を有した。このcDNAに対する転写は4.8kbであり、よく見られる大きい転写に対応する(下記参照)。

【0066】Jak2 ORFは計算分子量130kDaの1129アミノ酸をコードする。カイトとドゥーリトルのアルゴリズムを用いる親水性分析では、トランスメンブラン領域を同定しえなかった。これらの研究の結果として、Jak2の部分配列が公開された【ハーバー,

10

20

30

40

50

A. G. らの「Oncogene」, 7: 1347~1353 (1992) が、これは最初の143アミノ酸が欠損しているものであった。配列の比較から、コーディング領域における71ヌクレオチドの相異が指摘され、その結果、9個のアミノ酸が変更されたことがわかる(図1-3)。我々の得たcDNAクローンは、711位置の7個のアミノ酸の挿入を含まなかったため、ハーバーらの研究[「Oncogene」, 7: 1347~1353]の4個のcDNAのひとつであることがわかった。

【0067】マウスJak2遺伝子は、ヒトTyk2およびJak1遺伝子などの他のJakファミリーのメンバーと非常によく相関している(それぞれ42%と43%の同一性がある)。我々は、コーディング領域においてヌクレオチドレベルでJak2と45.5%の同一性があるマウスJak1遺伝子の全長cDNAクローンも得た。該ファミリーのその他のメンバーのように、マウスJak2タンパク質は、明確なSH2またはSH3ドメインが欠損する600個のアミノ酸長さのN-末端を持つ。これに続くのはキナーゼ関連ドメイン(ドメイン2)およびカルボキシルキナーゼドメイン(ドメイン1)である。カルボキシルキナーゼドメインは、タンパク質チロシンキナーゼに特徴的であるサブドメインVI~VIIに、固定残基を包含するタンパク質チロシンキナーゼに関連するすべての構造的および機能的モチーフを含む[ハンクス, S. K. らの「Science」, 241: 42~52 (1988)]。基質認識の一因であると仮定されるサブドメインVIIは、すべてのJakファミリーのメンバーに発見される独自のF-W-Yモチーフを有している。ドメイン2はアミノ酸543で始まり、タンパク質キナーゼの11の固定構造サブドメインのすべてを同定することができる。しかし、該アミノ酸組成と臨界キナーゼサブドメインI, II, VI, VIIにおける間隔の明確な相異から[ハンクス, S. K. らの「Science」, 241: 42~52 (1988)]、このドメインが制御機能を持つかあるいは現在未知の基質特異性を顕す可能性を引き起される。

【0068】Jakファミリータンパク質のN-末端は、キナーゼドメインよりも相同性が少ない(36~39%に対し、49~56%)けれども、Jakタンパク質のN-末端配列の比較から、幾らかの相同性の範囲が示される。Jak2のN-末端配列のデータベース調査からは、他のタンパク質との大きな相同性は示されないが、幾らかの高度に固定されたアミノ酸ドメインの存在から、Jakタンパク質が機能的に関連していることが示唆される。Jak相同ドメイン3を精密に比較すると、SH2ドメインにある程度の類似性がみられるが、この配列類似性の機能的意義は不確定のままである。

【0069】Jak2の発現型を次のマウス組織におけるノーザンブロット分析によって、研究した: 骨髄、卵管、卵巣、睾丸、胃、腸、骨格筋、腎臓、肝臓、胸腺、

脾臓、脳、胎児脳、胎児肝臓、胎児腸および胎児肺。次の細胞系のJak2の発現型もノーザンブロット分析によって、研究した: 骨髄細胞(32D. 3, NFS-70, NFS-107, NFS-124, DA-3, DA-22, DA-29, DA31, DA-24, M1)、マスト細胞系(AFSTh2)、B-細胞(DA-8, NFS-112, 形質細胞腫)、T-細胞(DA-2, EL-4, R-12)およびマクロファージ細胞系(BAC1. 2F5)。試験したすべての組織と細胞系において、4.4kbと4.8kbの2つの転写が検出されたが、発現レベルと2つの転写の相対的多量性は様々であった。比較的小さい転写は、骨格筋、脾臓および卵管に非常に多く、肝臓、腎臓および腸では僅かに検出できた。成人肝臓におけるJak2発現レベルは非常に低い、ところが胎児肝臓ではより多量のメッセージが検出された。分化の異なった段階および成長要求を呈している、3T3繊維芽細胞、Bリンパ球、Tリンパ球および各種骨髄細胞などの20個の細胞系において、Jak2の発現は検出された。

【0070】生化学的にJak2タンパク質を特徴付けるために、マウスJak1に較べ、Jak2に独特である領域(アミノ酸758~776(配列番号5))に対して、抗ペプチド抗血清を調製した。この抗血清の反応性を最初に評価するために、合成Jak2についてインビトロで免疫沈降を行った。Jak2RNAのインビトロ翻訳は予期された130kDaタンパク質を与えた。この130kDaタンパク質を、Jak2にみられない配列の、あるペプチドに対して調製された無関係の抗血清によってではなく、Jak2抗ペプチド血清によって免疫沈降した。免疫沈降は、無関係ペプチドまたはJak1の相同領域のペプチドによってではなく、Jak2抗血清が対向する相同ペプチドによって、競合された。Jak2抗ペプチド抗血清は、合成Jak1をインビトロにおいて免疫沈降しなかった。永続的に、Jak2抗ペプチド抗血清は、相同ペプチドによって特異的に競合されるインビボメチオニン標識細胞からの比較できる130kDaタンパク質も免疫沈降した。これらの結果から、Jak2cDNAが130kDaのタンパク質をコードし、抗ペプチド抗血清がJak2タンパク質を特異的に認識するということが明らかである。

【0071】成長因子依存細胞のIL-3刺激によって、IL-3受容体のβサブユニットを含む幾つかの細胞質のチロシンリン酸化が迅速に誘発される[イーレ, J. N. の「Interleukins: Molecular Biology and Immunology」, キシモト, T編, カーガー, ベイゼル, 65~106 (1992); ソレンセン, P. らの「J. Bio. Chem.」, 264: 19253~19258 (1989)]。したがって、我々は、Jak2がチロシンリン酸化の基質である可能性を検査した。

【0072】ホスホチロシン(4G10)に対するモノ

クローナル抗体による全細胞溶解産物のウエスタンブロットティングは、IL-3刺激に続く幾つかのタンパク質の出現を検出した、すなわち、130~140 kDaのブロードバンド、70 kDaのマイナーバンドおよび55 kDa、50 kDaおよび38 kDaのメジャーバンドである。細胞抽出物がJak 2抗ペプチド抗血清によって免疫沈降されたとき、非刺激細胞ではなく、刺激を受けた細胞において130 kDaタンパク質はたやすく検出された。Jak 2で共免疫沈降した110 kDa、70 kDaおよび60 kDaの誘発タンパク質の存在もまた注目すべきである。これらの基質は、Jak 2の免疫沈降において、常に観察されるものである。マウスJak 1に対する抗血清による免疫沈降では、Jak 1もまた基質であることを指摘する、130 kDaにおける弱いバンドが常に検出された。誘発するIL-3β鎖のチロシンリン酸化が、IL-3刺激細胞におけるJak 2に較べて僅かに減少された移動性を有する拡散したバンドとして、αIL3Rβ抗血清で免疫沈降された抽出物において観測された。したがって、Jak 2およびIL-3β鎖の両方からなる全細胞溶解産物においてブロードバンドが観察された。

【0073】IL-3がJak 2チロシンリン酸化を誘発することをさらに確証するために、ホスホチロシンに対する第2モノクローナル抗体を用いて、応答動力学および誘発検出能力を検査した。細胞をIL-3で刺激し、1G2抗ホスホチロシンモノクローナル抗体を含有するセファロースビーズに結合し、ビーズから溶離することによって、ホスホチロシン含有画分を単離したとき、Jak 2抗ペプチド抗血清を用いるウエスタンブロットによって、Jak 2は迅速に容易に検出された。比較する130 kDaバンドは非刺激細胞では検出されなかった。

【0074】Jak 2チロシンリン酸化は、IL-3刺激の5分後に容易に明白になり、続いて、IL-3刺激後に見られるチロシンリン酸化の一般パターンに較べて、幾分か減少した【イスフォート、R. らの「J. Biol. Chem.」, 263: 19203~19209 (1988)】。この期間中（IL-3刺激後0~120分）、Jak 2抗ペプチド抗血清を用いたウエスタンブロットで評価されたように、Jak 2のレベルは変化しなかった。

【0075】IL-3結合がJak 2キナーゼ活性に影響を与えるかどうかを決定するために、細胞を10分間IL-3で刺激し、Jak 2を免疫沈降させ、インビトロでのキナーゼアッセイを行った。結果を図13に示す。抽出物を正常ラビット血清で免疫沈降したとき、インビトロにおいて、非刺激細胞または刺激細胞からの抽出物にはキナーゼ活性は検出されなかった。しかし、抽出物をJak 2抗ペプチド抗血清で免疫沈降したとき、Jak 2 IL-3刺激細胞からの抽出物に、免疫沈降し

たJak 2と共移動する130 kDaが容易に検出された。対照的に、非刺激細胞の抽出物を用いたとき、130 kDaバンドは検出されなかった。130 kDaバンドのホスホアミノ酸分析から、優勢なホスホチロシンの存在が実証された。

【0076】面白いことに、これらのインビトロの反応において、IgGのH鎖などの他のリン酸化されたメジャータンパク質バンドはなかった（図8-12）。下記に議論したように、このことはJak 2キナーゼの基質特異性を反映している。Jak 1の対応領域に対するペプチドは影響がないとはいえ、Jak 2に対する特異性は、キナーゼ活性の沈降を封鎖するための対応ペプチドの能力によって示される。データとともに、Jak 2のチロシンリン酸化およびその自己リン酸化活性の活性化がIL-3刺激から起こることを実証している。

【0077】検討

我々の研究から、初めてマウスJak 2遺伝子の完成配列が提供される。3本の流れからなる証拠によって、我々が得たcDNAクローンが全コーディング領域を含むことを示す。第1に、マウスJak 2の5'配列をヒトTyk 2およびJak 1の公表された配列と比較すると、すべてのタンパク質が同じサイトから出発することがわかる。第2に、すべて解読枠において、停止コドンが最初のATGの上流に存在する。第3に、編集されたcDNAの大きさが、一貫して4.4および4.8 kbの大きさの転写である。

【0078】マウスJak 2 cDNAの配列は公表された該遺伝子の部分配列から変化しており【ハーバー、A. G. らの「Oncogene」, 7: 1347~1353 (1992)】、9個のアミノ酸が交換され、7個のアミノ酸が固定的置換されている。7アミノ酸の挿入が欠損した我々のcDNAクローンは、公表された配列の4個のJak 2 cDNAクローンのひとつであることが判明した。同様な推定追加エクソンもまたヒトTyk 2 cDNAにおいて観察された【ベラケツ、L. らの「Cell」, 70: 313~322 (1992)】。

【0079】造血成長因子依存細胞のIL-3刺激が、多くの細胞基質のチロシンリン酸化を迅速に誘発することが示されている【イーレ、J. N. の「Interleukins: Molecular Biology and Immunology」, キシモト、T. 編、カーガー、ベイゼル、65~106 (1992)】；イーレ、J. N. の「Peptide Growth Factors and Their Receptors」, スポーンとロバート編、スプリングー、ニューヨーク (1990)】。我々の結果は、これらの基質のひとつがJak 2であることを証明する【イーレ、J. N. の「Interleukins: Molecular Biology and Immunology」, キシモト、T. 編、カーガー、ベイゼル、65~106 (1992)】。IL-3依存細胞で発現され、我々が検査できるタンパク質チロシンキナーゼの中に、Jak 2に対する注目すべき特異性があった。

【0080】特に、lyn, tecまたはc-fesのチロシンリン酸化には、どんな変化も検出されない。しかし、IL-3刺激後の低レベルのJak1のチロシンリン酸化は一貫して見られる。これは、使用した抗血清の交差反応性のためではなく、Jak1とJak2の両方が細胞中に比較し得るレベルで発現されるので、タンパク質レベルにおける相異のためではない。したがって、Jak1はJak2と充分な類似性をもち、IL-3受容体複合体と弱い結合をする。一方、潜在的自己リン酸化サイトにおいてJak1とJak2の間に考慮すべき配列相同性があるので、Jak1はJak2の基質であってよい。現在まで、Jak1には、インビトロでのキナーゼ活性に対するIL-3刺激の影響は検出されていない。

【0081】IL-3刺激により、Jak2のチロシンリン酸化の誘発およびJak2インビトロキナーゼ活性の活性化がおこる。Jak2のカルボン酸タンパク質チロシンキナーゼドメインには、多くのキナーゼのキナーゼ活性の活性化に関連する独特の自己リン酸化サイトが含まれる[ハンクス, S. K. らの「Science」, 241: 42~52 (1988)]。インビボのチロシンリン酸化は、チロシンリン酸化の付随現象および検出するインビトロキナーゼ活性に基づき、このサイトで起こると予期される。

【0082】キナーゼ活性の検出のためにIL-3結合が必要であるということは、成長制御における主要な役割として徹底的に細胞中でJak2キナーゼ活性が高度に制御されていることを示す。インビトロのキナーゼ反応の初期基質はJak2である。特に、免疫グロブリンの検出するリン酸化がなく、エノラーゼはJak2の基質ではないということは、Jak2が完全な基質特異性を有することを示している。受容体活性化および基質特異性の要求から、過去の研究における種々の条件下におけるJak1タンパク質チロシンキナーゼ活性が実証できないことが説明される[ウィルクス, A. F. らの「Mol. Cell. Biol.」, 11: 2057~2065 (1991)]。

【0083】また、Jak2はEpo刺激後も、チロシンリン酸化され、活性化される(実施例2参照)。そのうえ、これらの研究は、機能に必須のEpo受容体(EpoR)の細胞質ドメインの膜近位領域にJak2が物理的に関連することを実証した。Jak2が物理的にIL-3受容体のサブユニットの1つあるいは両方に関連するかどうかは現今検査されている。しかし、EpoRのように、IL-3受容体のβサブユニットは迅速にチロシンリン酸化され、このリン酸化にはJak2が介在すると仮定できる。EpoRの場合、チロシンリン酸化は細胞質中のカルボキシル末端にあるサイトで起こり、この領域はマイトジェネシスには要求されない。IL-3βサブユニットのチロシンリン酸化が生物学的応答に

寄与するかどうかは、未知である。

【0084】IL-3とEpoの両方のチロシンリン酸化誘発およびJak2活性化能力から、Jak2が幾つかのサイトカイン受容体のシグナル形質導入通路の成分である可能性が示唆される。GM-CSFおよびG-CSFがJak2のチロシンリン酸化を誘発することも分かっている。このことは、これらの造血成長因子がチロシンリン酸化の比較しうる型を誘発することを示した幾つかの研究と一致する[イーレ, J. N. の「Interleukins: Molecular Biology and Immunology」, キシモト, T. 編, カーガー, ベイゼル, 65~106 (1992)]。マクロファージ細胞系においてIFNγに応答したJak2のチロシンリン酸化も観察された。

【0085】造血成長因子は、受容体スーパーファミリーのメンバーであり、該スーパーファミリーには成長ホルモン、プロラクチン受容体、繊毛の神経親和性因子などの受容体も含まれる[ベイザン, J. F. の「Science」, 257: 410~413 (1992)]。さらにそのうえ、関係が深いとはいえないが、インターフェロン受容体は、一般の前駆細胞から放出されると推測されている。最近の研究[ベラケツ, L. らの「Cell」, 70: 313~322 (1992)]には、Tyk2がIFNαシグナリングに関係していることが示されている。我々の研究は、Jak2がIL-3およびEpo(実施例2参照)、ならびにG-CSF, GM-CSFおよびIFNγのシグナリング通路に関係していることを示した。さらに、最近の研究は、Jak2が成長ホルモンへの応答に関係があるとしている。したがって、Jakファミリーキナーゼは、受容体のサイトカイン/インターフェロンスーパーファミリーのメンバーの幾つかによって使用されるシグナル形質導入に関係している。さらにそのうえ、キナーゼのJakファミリーは、ISGF3αタンパク質[シンドラー, C. らの「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 89: 7836~7839 (1992)]；フー, X. Y. らの「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 89: 7840~7843 (1992)]および、ICSBP, IRF1, IRF2およびおそらくmybなどのDNA結合タンパクに関連するISGF3γに関連するファミリーメンバーを含む、比較し得る通路を経る遺伝子発現をも制御する[ヴィールス, S. A. らの「Mol. Cell. Biol.」, 12: 3315~3324 (1992)]。

【0086】実施例2 エリスロポイエチン受容体に関連するJak2およびエリスロポイエチンによる刺激に続くチロシンリン酸化および活性化

要約

エリスロポイエチン(Epo)は赤系系統細胞の増殖および末端分化を、その受容体(EpoR)との相互作用により制御する。EpoRはサイトカイン受容体ファミリー(群)のメンバー(仲間)であり、同定可能なキナーゼ

触媒ドメインを欠く細胞質ドメインを含む。しかしながら、Epoの結合はEpoRのチロシンリン酸化、および多くの細胞性蛋白を急速に導く。チロシンリン酸化を導く能力は、受容体の、直接の早期遺伝子の転写の誘導および分裂促進の能力と緊密に関連している。これらの生物学的反応は受容体細胞質ドメインの膜基部領域の必要性として示される。本明細書で、本発明者らは蛋白チロシンリン酸化の基質の1つが130KDaの蛋白チロシンキナーゼであるJak2であることを証明する。さらに、Epoの刺激はJak2のイン・ビトロ自己リン酸化活性を活性化する。EpoRの一連の変異体を使用して、Jak2チロシンリン酸化の誘導および自己リン酸化活性は生物学的反応の誘導に関連して発見された。さらに、Jak2は生物学的活性に必要なEpoR細胞質ドメインの膜基部領域と物理的に関連していることを示す。結果は、Jak2がチロシンリン酸化と連結するEpoおよび結局は赤血球形成に必要な生物学的反応と関連していることを示唆する。

【0087】導入

造血は種々の造血成長因子とそれらの連結受容体との相互作用により制御されている(クラークおよびカメン、サイエンス(Science)、236:1229-1237(1987)、メトカルフ、D、ネイチャー(Nature)339:27-30(1989))。造血成長因子の多くは、細胞外領域の4つの位置的に保護されたシステインおよびWSXWS(配列番号1)モチーフの存在を特徴とする通常のサイトカイン受容体群に属している。本群は、非常に限定された配列相同性を示す大きい可変性細胞質ドメインをまた特徴とし、ドメインは信号導入機構を導く同定可能なモチーフを含まない。エリスロポイエチン(Epo)は赤色系統の細胞の増殖および末端分化を独特に支持する造血成長因子である(克蘭ツ、S.B.、ブロード(Blood)77:419-434(1991))。Epo受容体(EpoR)は発現クローニング(ダンドレアら、セル(Cell)57:277-285(1989))によりクローンされ、cDNAの配列から単一膜架橋ドメインの507アミノ酸の蛋白およびサイトカイン受容体スーパーファミリーに関連したモチーフが予測される。いくつかの造血成長因子受容体と異なって、単一遺伝子生成物はEpo結合および機能に充分であることが示される(ダンドレアら、セル(Cell)57:277-285(1989))。

【0088】EpoRのIL-3依存性細胞への導入は、Epoに応答した増殖に対する細胞の能力に寄与し、これは受容体信号導入の研究に重要なモデルを提供する(ダンドレアら、セル(Cell)57:227-285(1989);ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)11:4895-4902(1991))。形質導入細胞中、Epoはc-myc、c-fos、c-pim-1およびegr-1を

含む一連の直接の初期遺伝子の発現を誘導する(ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol)13:1788-1795(1993))。さらに、Epoは一連の細胞性基質の急速チロシンリン酸化を誘導し(リンネキンら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)89:6237-6241(1992);ドゥサンター・フォールトラ、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)267:10670-10675(1992);ケレおよびウジコスキ、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem)266:609-614(1991);ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol)11:4895-1902(1991);ヨシムラおよびローディッシュ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol)12:706-715(1992);ダーメンら、ブロード(Blood)80:1923-1932(1992))、EpoRが共役リガンドの結合により、蛋白チロシンキナーゼの活性化に機能し得ることが示唆される。チロシンリン酸化を誘導するEpoの基質の1つは受容体である(ドゥサンター・フォールトラ、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem)267:10670-10675(1992);ヨシムラおよびローディッシュ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)12:706-715(1992);ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol)11:4895-4902(1991))。

【0089】EpoRの細胞質ドメインは236アミノ酸を含み、IL-2受容体β鎖の細胞質ドメインと類似のいくつかのアミノ酸配列を含む(ダンドレアら、セル(Cell)58:1023-1024(1989))。EpoRはまた最初にIL-6信号導入gp130蛋白中で定義された、サイトカイン受容体保存ドメイン、ボックス1および2と命名、と類似の領域を含む(ムラカミら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)88:11349-11353(1991))。細胞質ドメインの膜基部領域は受容体の生物学的活性の本質であることが示されている。108アミノ酸のカルボキシル末端切断は受容体の直接の初期遺伝子の誘導、チロシンリン酸化の誘導または分裂促進の原因である能力に影響をおよぼさない(ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol)13:1788-1795(1993);ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)11:4895-4902(1991))。いくつかの細胞系では、カルボキシル末端切断は分裂促進反応を増加させ(ダンドレアら、モレキュラー・アンド・セルラー

・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 11: 1980-1987(1991)), 膜遠位領域はEpoの応答により負の影響を受けることを示唆する。

【0090】膜基部領域内で、カルボキシル末端切断またはボックス1および2ドメインの消滅は、全ての生物学的活性に対して受容体を不活性にできる(ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 13: 1788-1795(1993); ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 11: 4895-4902(1991))。この領域の重要性は、ボックス1とボックス2の間の保護Trp残基の変異による受容体機能の不活性化によりさらに証明された。この結果により、EpoRの膜基部領域は、チロシンリン酸化の誘導を含む試験している全ての生物学的反応の本質であることが証明される。

【0091】生物学的活性のために、タンパク質チロシンのリン酸化におけるEpoRの重要性は明らかに証明されるが、含まれているべきキナーゼ類に関しては殆ど知られていない。EpoRのカルボキシル領域のチロシンリン酸化の急速誘導は(ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 11: 4895-4902(1991); ヨシムラおよびローディッシュ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 12: 706-715(1992); ドウサンター・フォールト、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.) 267: 10670-10675(1992)), 受容体がキナーゼと構造的にまたはリガンド結合に続いていずとも緊密に関連していることを示唆する。ある研究(ヨシムラおよびローディッシュ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 12: 706-715(1992))は受容体と架橋結合している130kDaの非グリコシル化蛋白を同定し、それはイン・ビボまたはイン・ビトロキナーゼ測定の内いずれでも、抗ホスホチロシン抗体により検出される能力により評価される測定ではチロシンリン酸化されていた。130kDaがキナーゼか否かは決定できなかった。最近の研究(リネッキンら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89: 6237-6241(1992))で、ATPのアジド誘導体で放射能標識したチロシンリン酸化の97kDa基質をまた同定し、それがキナーゼであることが示唆された。130kDaまたは97kDaの内いずれが最近特徴付けられたキナーゼである可能性は未決定である。

【0092】Epo信号導入に含まれるべき新規である可能性のある蛋白チロシンキナーゼの決定のために、本発明者らはウィルクス、A. F.、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・

ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)に記載されていると同様のPCR増幅法を利用した。ウィルクスら(ウィルクス、A. F.、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 86: 1603-1607(1989); ウィルクスら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 11: 2057-2065(1991))および他の(パータネンら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87: 8913-8917(1990))研究と同様に、生成物の2つは緊密に関連した遺伝子であり(Jak1およびJak2)、それはTyk2遺伝子(フィルムバツハー・クラフトら、オンコジーン(Oncogene) 5: 1329-1336(1990))もまた含む、(別に全く別のキナーゼ群のように言及される)ジャヌス(Janus)キナーゼ類と呼ばれる比較的新しいキナーゼサブファミリーに含まれる。Tyk2遺伝子生成物は、最近、インターフェロン α (INF α)受容体を經由した信号導入に関係つけられている(ペラズケッツら、セル(Cell) 70: 313-322(1992))。

【0093】Jak1およびJak2遺伝子の造血信号導入における潜在的役割を調査するために、本発明者らはマウス遺伝子の完全な長さのcDNAクローンを単離し、蛋白に対する抗血清を調製した(実施例1参照)。本発明者らは本明細書でEpo刺激が急速にJak2の特異的チロシンリン酸化を誘導することおよびそのイン・ビトロキナーゼ活性を活性化することを報告している。チロシンリン酸化の誘導およびキナーゼ活性の活性化は、分裂促進の本質であるEpoR細胞質ドメインの膜基部領域に依存する。最後に、本発明者らはJak2がEpoRに物理的に関連し、この関連が膜基部領域に必要であることを述べる。データから、Jak2はEpoR信号導入を含むことを証明する。

【0094】結果

Jak2はEpo刺激に続き特異的にそして急速にチロシンリン酸化される

EpoはEpoの受容体を含む多くの細胞性基質のチロシンリン酸化を急速に誘導し、受容体は細胞質チロシンキナーゼに関係することを示唆する(ヨシムラら、ネイチャー(Nature) 348: 647-649(1990); ダーメンら、ブロード(Blood) 80: 1923-1932(1992); ケレおよびウジコースキー、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 266: 609-614(1991); ケレ、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 267: 10670-10675(1992))。含まれているべきキナーゼを同定するために、本発明者らおよび他の研究者(ウィルクス、A. F.、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・

ユーエスエー(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)86:1603-1607(1989);ウィルクスら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)11:2057-2065(1991)パータネンら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・ユーエスエー(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)87:8913-8917(1990);実施例1参照)は造血成長因子依存性細胞系に存在している既知のおよび潜在的新規キナーゼの検出にPCR法を使用している。これらの研究では、ノーザン・ブロット分析を組み合わせ、DA3骨髄細胞中のlyn、c-fes、tec、Jak1およびJak2に対する転写を同定した(マノラ、オンコジーン(Oncogene)8:417-424(1993))。

【0095】これらのキナーゼの何れがEpo信号導入に含まれているかをまず決定するために、本発明者らは以下のように誘導されるチロシンリン酸化の能力を測定した。DA3(EpoR)細胞は約14時間で成長因子から除去された。細胞は刺激されない(-)または30U/mlのヒトEpoで10分間刺激された(+)何れかであった。細胞はその後遠心により回収し、細胞抽出物は下記の実験方法で記載した通りに調製した。非刺激および刺激細胞からの抽出物のアリコート(2×10⁷細胞)をJak2、Jak1、c-fes、lynまたはtecに対する抗血清で免疫沈降した。免疫沈降物をSDS-PAGEに溶解し、ニトロセルロース膜へ転移し、フィルターは4G10抗ホスホチロシンモノクローナル抗体で実験方法に記載した通りに試験した。それぞれの免疫沈降チロシンキナーゼのレベルを評価するために、同等なブロットを個々のキナーゼに対する抗血清で下記の実験方法に記載のように試験した。

【0096】上記の実験中、Epo刺激の結果Jak2に対する抗血清で沈降したp130kDaバンドが発現した。このバンドは免疫沈降を抗血清が上昇するペプチドの存在下で行った場合、観察されなかった。ブロットをホスホチロシン(PY20)に対する異なるモノクローナル抗体で試験した場合、同等の結果が得られた。比較すると、lyn、fesまたはtecは同等な条件ではチロシンリン酸化の誘導は示さなかった。

【0097】弱い130kDaのバンドは、上記に示した種々の試験でJak1に対する抗血清でも見られた。これは抗血清の交差反応性によるものではなかった。両方の抗血清はJak1とJak2の間を同定する最小配列に対して、およびイン・ビトロ翻訳反応由来の適当なキナーゼの免疫沈降に対してのみ調製された。結果から、Jakキナーゼ類はEpoに反応してチロシンリン酸化を誘導するだけでなく、Jak2は選択的にリン酸化されることを示す。

【0098】Epo刺激がJak2のチロシンリン酸化を誘導することをさらに確立するために、本発明者らは

1G2モノクローナル抗体の能力をリン酸化の変化の検出により試験した。細胞を上記のように処理し、融解し蛋白の画分を含むホスホチロシンを、先行技術(フラッケルトンら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)3:1343-1352(1983);イスフォートら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)263:19203-19209(1988))のように1G2モノクローナル抗体セファロースビーズへの結合および溶出によって単離した。溶出蛋白はSDS-PAGEに溶解し、フィルターにブロットし、フィルターをJak2に対する抗血清で試験した。結果は下記の通りであった。Epoはp130kDaのバンドを誘導し、それは1G2溶出物中のJak2に対する抗血清で容易に検出可能であった。全細胞溶解質のウェスタン・ブロット法で同等なレベルのp130kDaのJak2が刺激および非刺激細胞の両方に示された。lyn、tecまたはc-fesに対する抗血清のブロットの試験ではこれらのキナーゼの検出に失敗した。

【0099】チロシンリン酸化Jak2の発現の動態を測定するために、DA3(EpoR)細胞をEpo処理後0、5、10、30、および60分後に調製し、Jak2に対する抗血清で免疫沈降を行い、免疫沈降物をSDS-PAGEに溶解した。蛋白をニトロセルロースに転移させ、4G10モノクローナル抗体でウェスタンブロットを行った。これらの条件下、130kDaバンドが容易の誘導は明白であった。刺激は5分で最大であり、その後減少し1時間後では明白でなかった。上記の結果から、Epo刺激は、他の蛋白チロシンキナーゼと比較して、成長因子依存細胞中、急速で特異的なJak2のチロシンリン酸化を起こす。

【0100】Epo刺激はJak2イン・ビトロキナーゼ活性を活性化する

蛋白チロシンキナーゼのチロシンリン酸化は一般にキナーゼ活性の活性化に関連する(ハンクスら、サイエンス(Science)241:42-52(1988))。したがって、本発明者らは免疫沈降物中のイン・ビトロJak2キナーゼ活性を試験した。これらの実験中、細胞はEpoで10分間刺激し、次に細胞抽出物を調製し、正常ウサギ血清(NRS)またはJak2特異的抗血清の何れかで免疫沈降を行い、イン・ビトロキナーゼ測定を行いリン酸化蛋白をSDS-PAGEに溶解した。正常ウサギ血清の抽出物の免疫沈降物では、非刺激またはEpo刺激細胞で、イン・ビトロキナーゼ活性は測定不可能であった。対照的に、Jak2抗血清の抽出物の免疫沈降物はEpo刺激細胞は容易に検出可能なキナーゼ活性があった。リン酸化の主要な産物は130kDa蛋白であり、それはJak2と共に移動する。同等な活性は非刺激細胞の抽出物からは検出されなかった。Jak2への特異性は、Jak2抗血清がキナーゼ活性の免疫沈降を

阻止するために増加する、蛋白の能力により誘導され、一方 J a k 1 に相当する領域の蛋白は影響を受けなかった。2 次元薄層電気泳動によるイン・ビトロキナーゼ測定で検出された最初のホスホアミノ酸はチロシンであると決定された。

【0101】分裂促進性と関連した J a k 2 のチロシンリン酸化およびイン・ビトロキナーゼ活性の活性化
本発明者らの先の研究(ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 11: 4895-4902 (1991); ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 13: 1788-1795 (1993))では、チロシンリン酸化の誘導の本質である E p o R の細胞質の膜基部領域が、いくつかの直接の初期遺伝子の発現および分裂促進性を誘導することを述べた。したがって、J a k 2 リン酸化が相同ドメインを必要とするか否か、J a k 2 リン酸化がこれらの生物学的応答に関係しているか否かの測定が重要であった。したがって、われわれは一連の変異受容体が媒介している E p o - 誘導チロシンリン酸化の試験をした。E p o R の H 変異体はカルボキシル末端の 108 アミノ酸を欠くが、同等な生物学的活性をもつ(ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 13: 1788-1795 (1993))。

【0102】H 変異体を誘導する細胞への E p o 刺激は 130 k D a のバンドのチロシンリン酸化をおこす。H 変異株を発現する細胞の J a k 2 チロシンリン酸化は野生型受容体を発現する細胞のものより強いことが観察されたことはまた注目すべきである。これは、下記のパネルに示したように、J a k 2 のいくらか高いレベルによるものかまたは受容体のカルボキシル基の陰性活性領域の除去によるものであろう(ダンドレア、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 11: 1980-1987 (1991))。これらの実験でまた注目されることは、野生型受容体が発現する細胞の抽出物からの J a k 2 免疫沈降で検出された誘導可能な 72 k D a リン蛋白の存在である。これは E p o R の予測した大きさであり、それが E p o R である可能性は、カルボキシル末端切断によりチロシンリン酸化部位が除去された H 変異体での実験と同等なバンドの欠落によりさらに支持されている(ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 11: 4895-4902 (1991))。この観察が E p o R が J a k 2 と物理的に関連があり得ることを示唆する。

【0103】H 変異体よりさらに進んだカルボキシル切断、例えば受容体のカルボキシル 146 アミノ酸を欠如した S 変異体では、D A - 3 細胞中で受容体のチロシンリン酸化の誘導、直接の初期遺伝子の誘導および分裂促進性を不活性化する(ミウラ、モレキュラー・アンド

・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 11: 4895-4902 (1991))。この変異体を発現する細胞の E p o 刺激に続く J a k 2 チロシンリン酸化の誘導は観察されなかった。

【0104】本発明者らは、以前に細胞質ドメインの膜基部領域の 20 アミノ酸の欠如(P B 変異体)はすべての生物学的活性において受容体を不活性化することも述べた。J a k 2 のチロシンリン酸化はこの変異体を発現する E p o 処理細胞では検出されなかった。

【0105】最後に、本発明者らはボックス 1 および 2 領域の間に保護された W 残基の W²⁸² -> R の不活性変異を含む部分変異体、P M 4 で試験した(ミウラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.) 13: 1788-1795 (1993))。J a k 2 のチロシンリン酸化はこの変異体を発現する E p o 処理細胞では検出されなかった。

【0106】本発明者らは次に J a k 2 チロシンリン酸化の誘導および分裂促進性とイン・ビトロ J a k 2 キナーゼ活性の能力の関係を試験した。種々の変異体を発現する細胞のクローンは、刺激をしていないものと E p o で 10 分刺激したものであった。細胞を融解し J a k 2 を免疫沈降し、沈殿を上記のようにイン・ビトロキナーゼ測定に使用した。リン酸化は免疫沈降物を S D S - P A G E に溶解し、オートラジオグラフィーを行って測定した。

【0107】先に述べた結果のように、反応物中で検出されたリン酸化による主要な生成物は 130 k D a リン蛋白であり、それは J a k 2 の位置へ移動する。J a k 2 のリン酸化は E p o で刺激された細胞で明白であり、H 変異体で分裂促進活性を示した。分裂促進不活性の S 末端切断変異体、P B 欠損変異体または P M 4 部分変異体が発現する E p o 刺激細胞の免疫沈降物ではキナーゼ活性は検出されなかった。これらの結果、生物学的活性の本質である膜基部領域がまた J a k 2 チロシンリン酸化の誘導およびそのキナーゼ活性の活性化に必要であることを証明している。

【0108】E p o R を発現する 3 T 3 細胞での J a k 2 関連チロシンリン酸化誘導

J a k 2 は多くの種々の細胞系統で発現される(実施例 1 参照)(ハーバーら、オンコジーン(Oncogene) 7: 1347-1353 (1992))。したがって、本発明者らは非造血系統で J a k 2 が E p o R と結合しているか否かおよびチロシンリン酸化を誘導するか否かを測定した。このために、本発明者らは、E p o R 発現構築物を形質導入され、E p o に対して高親和性の受容体を発現する 3 T 3 線維芽細胞の応答を試験した。

【0109】E p o 刺激が線維芽細胞が発現する受容体のチロシンリン酸化と関連しているか否かを最初に測定するために、E p o の細胞蛋白および受容体のチロシンリン酸化誘導能力を測定した。3 T 3 (E p o R) 細胞が

らの抽出物のプロットが抗ホスホチロシンモノクローナル抗体と試験された場合、種々のバンドが検出され、Epoで処理した細胞との検出可能な差はみられなかった。しかしながら、抽出物を最初にEpoRに対する抗血清と免疫沈降し、プロットをホスホチロシン含有蛋白と試験した場合、72kDa蛋白はEpo刺激細胞中に検出され、EpoRのチロシンリン酸化誘導と一致した。

【0110】細胞抽出物を最初にJak2に対する抗血清と免疫沈降し、続いてホスホチロシン含有蛋白またはJak2をプロットした場合、得られた結果は下記の通りであった。非刺激およびEpo刺激線維芽細胞の免疫沈降物はJak2に対する抗血清のプロットを試験することにより評価されたのと同様なレベルのJak2を含んでいた。Epoによる細胞の刺激に続いて、Jak2と共に移動する130kDaのバンドがホスホチロシン(4G10)に対するモノクローナル抗体で容易に検出できた。同等なバンドはEpoRを含有しない対象線維芽細胞では検出されなかった。これらのデータはEpoRが線維芽細胞のJak2と機能的に結合することができ、Jak2のEpoチロシンリン酸化誘導を媒介することを証明する。

【0111】Jak2はエリスロポイエチンの分裂促進的に活性な受容体に関連しているEpoRおよびJak2のチロシンリン酸化の急速な誘導は、Jak2が物理的にEpoRと関連している可能性を示す。この可能性は特に興味をそそられた、なぜなら先行研究(ヨシムラおよびローディッシュ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)12:706-715(1992))が130kDa蛋白を同定し、それがEpoRと架橋し得、イン・ビトロでリン酸化され得るからである。Jak2とEpoRの関連の可能性はまた種々の実験で示唆されており、そのなかでホスホチロシンがJak2と共免疫沈降する72kDaを含んだ。

【0112】Jak2のEpoとの物理的関係の可能性を直接試験するため、野生型細胞質ドメインおよび変異EpoR類を含む一連のGST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)-融合蛋白を構築し細菌で発現させた。融合蛋白はグルタチオンセファロースビーズへの結合の親和性により精製し、親和性ビーズ上の蛋白は非刺激またはEpo刺激DA3(EpoR)細胞抽出物と共にインキュベーションした。結合蛋白をビーズから回収し、SDS-PAGEに溶解し、ニトロセルロースヘゲルをプロットした。プロットは種々の型のチロシンキナーゼに対する抗血清と続いて試験した。

【0113】130kDa蛋白は、非刺激または刺激細胞由来の抽出物のいずれかが使用された場合、容易に検出可能であり、プロットがJak2に対する抗血清と試験された。130kDa蛋白は、抗血清を過剰のペプチドとインキュベーションした場合、上昇されるため、検

出できなかった。130kDa蛋白はJak1に対する抗血清と共に、Jak2に対する抗血清で見られたのより低い濃度ではあるが、検出可能であった。プロットがそれぞれの抗血清と試験された場合、lyn、c-fesまたはtecの存在により構成されるであろうバンドは検出できなかった。これらの結果は、試験したチロシンキナーゼの中で、Jak2がEpoRの細胞質ドメインを含むGST融合蛋白と関連していることを証明する。

【0114】もし上記で検出されたJak2およびEpoRの物理的関連が生物学的に相関している場合、受容体の分裂促進活性に影響する変異体が結合を変え、逆に、生物学的活性に影響しない受容体の末端切断が結合に影響しないということが予期できるであろう。この可能性を探究するために、融合蛋白は末端切断されているが分裂促進活性であるH変異体および分裂促進不活性PBおよびPM4変異体の細胞質領域を含むように構築された。細胞抽出物をグルタチオンセファロースに結合させたGST単独と共にインキュベーションし、プロットをJak2に対する抗血清を用いて試験した結果、130kDa蛋白は検出されなかった。対比して、H変異体の完全な細胞質ドメインまたはカルボキシ末端切断細胞質ドメインを含む融合蛋白を使用した場合、130kDa蛋白は容易に検出できた。130kDa蛋白は抽出物をPB変異体欠損部分を含む融合蛋白とインキュベーションした場合、検出されなかった。しかしながら、130kDa蛋白は分裂促進不活性PM4変異体を含む融合蛋白を使用した場合、検出された。これはおそらく、下記に述べるように、機能対物理相互作用を検出する測定の違いによるものである。これらの結果は、分裂促進性に必要な膜基部領域がまたEpoRとJak2の関係を媒介していることを示唆する。

【0115】結論

これらの研究は、EpoRに関連した蛋白チロシンキナーゼを同定した最初のものであり、EpoRはチロシンリン酸化されリガンド結合の応答を活性化する。先の研究は、Epoの結合は細胞性基質のチロシンリン酸化を急速に誘導し、この能力は分裂促進性の誘導と密接に関連していることを述べている(ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)11:4895-4902(1991);ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)13:1788-1795(1993))。したがって、生物学的応答に結合しているEpoと組み合わせられているキナーゼ(またはキナーゼ類)を同定することはかなり興味深いことである。PCR法を用いて(ウィルクス、A.F., プロシーディングス・オブ・ナチュラ・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 86:1603-1607(1989);ウィルクス、A.F., メソッズ・オブ・エンザイモ

ロジー (Meth. Enzymol.) 200: 533-546 (1991); パータネンら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87: 8913-8917 (1990); マノら、オンコジーン (Oncogene) 8: 417-424 (1993)、骨髓細胞に存在し、信号伝達に寄与しているであろう蛋白チロシンキナーゼのスペクトルの決定が試みられた。

【0116】 IL-3/Epo 依存性細胞で発現されるキナーゼの中で、src 遺伝子群キナーゼの仲間である lyn が信号伝達において興味がある。これは T 細胞の IL-2 刺激が lck キナーゼに非常に関連したキナーゼ活性の上昇の原因となるという証明 (ホラックら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 88: 1996-2000 (1991)) および lck が IL-2 受容体 β 鎖の細胞質ドメインと物質的に関連しているという証明に基づいている (ハタケヤマら、サイエンス (Science) 252: 1523-1528 (1991))。しかしながら、lck は、分裂促進性には必要でない IL-2 受容体 β 鎖領域と関連しているということは注目すべきである (ハタケヤマら、セル (Cell) 59: 837-845 (1989); ハタケヤマら、サイエンス (Science) 252: 1523-1528 (1991))。lyn の IL-3 信号伝達における役割は、IL-3 刺激が lyn キナーゼ活性を上昇させるということを示した報告により示唆されている (トリゴエら、ブラッド (Blood) 80: 617-624 (1992))。しかしながら、本発明者らは試験した造血成長因子依存性細胞中で IL-3 または Epo いずれも lyn キナーゼ活性に対する、一貫した効果を有することを観察できなかった。本明細書に説明したように、lyn のチロシンリン酸化の段階での Epo の結合による影響の検出および lyn と EpoR の関係の証明もできていない。

【0117】本発明者らは tec チロシンリン酸化、キナーゼ活性の活性化 (データは示していない) のいかなる変化、または EpoR との関連を検出することができなかった。Tec は骨髓細胞に発現し (マノら、オンコジーン (Oncogene) 8: 417-424 (1993))、その潜在的重要性は T 細胞中、itk (IL-2 誘導可能 T 細胞キナーゼ) および B 細胞 BPK/atk (B 細胞前駆体キナーゼ、無ガンマグロブリン血症チロシンキナーゼ) のキナーゼ類と非常に関連があるという同定から示唆される (シリカノら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89: 11194-11198 (1992)); ツカダら、セル (Cell) (投稿中、1993); ベトリーら、ネイチャー (Nature) 361: 226-233 (1993))。BPK/atk 遺伝子は X-結合無ガンマグロブリン血症 (XLA) と緊密に

関連しており、キナーゼ活性は XLA B 細胞前駆体細胞および B 細胞系では減少または欠損している (ツカダら、セル (Cell) (投稿中、1993))。さらに、キナーゼが不活性であると予想される遺伝子的に獲得された変異体は XLA の患者中の BPK/atk から検出された (ビトリーら、ネイチャー (Nature) 361: 226-233 (1993))。従って、BPK/atk は B 細胞の信号において重要な役割を担っているようである。tec が骨髓のさらに限定された反応に含まれているという可能性について現在試験している。

【0118】本発明者らは、細胞増殖を制御している c-fes 遺伝子の Epo 信号伝達経路における役割も観察していない。最近の研究では、c-fes 発現レベルが分化により増加し、c-fes の骨髓細胞への活性形での導入は分化により促進されるため (ボレリーニら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 266: 15850-15854 (1991))、および c-fes アンチセンス構築が分化により妨げられるため (フェラーリら、セル・グロース・アンド・ディファレンテーション (Cell Growth Differ.) 1: 543-548 (1990))、c-fes が骨髓細胞の末端分化を伴い得ることが示唆される (ボレリーニら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 266: 15850-15854 (1991))。

【0119】lyn、tec または fes で得られた結果と比較して、Jak2 の実験では、チロシンリン酸化、キナーゼ活性の活性化および EpoR との関係する能力の効果が容易に証明できた。さらに、結果は Jak1 に対するより Jak2 に対する特異性が非常に厳密であった。Jak1 および Jak2 は非常に関係し、両方の触媒領域を同定する同等なアミノ酸配列およびアミノ末端領域をもつ (ハーパーら、オンコジーン (Oncogene) 7: 1347-1353 (1992); 本明細書の実施例 1 もまた参照)。Jak2 のアミノ酸配列は、計算した大きさ 130 kDa の 1129 個のアミノ酸の蛋白をコードし、それはマウス Jak1 キナーゼと 45.5% の相同性がある。

【0120】本発明者らの研究では Jak2 に対する明白な特異性があるが、Jak1 でも全ての測定で低濃度で矛盾なく検出された。これは、使用した全ての抗血清は広い同一アミノ酸を含まない領域由来の蛋白に対するものであるため、抗血清の交差反応性によるものではなかった。さらに、抗血清の交差反応性の欠如はイン・ビトロ翻訳蛋白のイン・ビトロでの反応性の試験でも確認された (実施例 1 参照)。反応性の相違は、両方の発現が同等なレベルであるため、2 種のキナーゼの発現のレベルの差によるものではない。従って、これは Jak1 および Jak2 の間の充分な相同性が Jak1 を低いレベルではあるが EpoR と関連しているように思える。

【0121】EpoのJak2チロシンリン酸化の誘導は、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体の反応性の変化により測定した。重要なことには、チロシンリン酸化は4G10およびPY20モノクローナル抗体の両方で、ウェスタン・ブロット法により容易に証明可能であった。加えて、Jak2はEpo刺激細胞から、セファロースに結合した1G2抗ホスホチロシンモノクローナル抗体によるアフィニティークロマトグラフィーで単離されたが、非刺激細胞からはされなかった。これらの方法は蛋白チロシンリン酸化の変化の検出に通常使用されている。

【0122】本発明者らの結果は、Epo刺激はJak2のイン・ビトロキナーゼ活性を活性化し、その最初の基質はJak2であることを証明している。先の研究で、Jak1のキナーゼ活性を証明することは難しいことがわかった。特にウィルクスら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)11:2057-2065(1991)は種々の条件下でのJak1免疫沈降物中の蛋白チロシンキナーゼ活性の検出ができなかった。しかしながら、彼らは細菌中のJak1のカルボキシルキナーゼ領域と共に融合蛋白を含む発現構築物で蛋白チロシンリン酸化を証明できた。アミノ末端キナーゼ様ドメインを含む同等の融合蛋白は活性がなかった。興味深いことに、比較的少ない細菌蛋白がリン酸化され、Jak1は限定された基質特性をもち得ることが示唆される。本発明者らの結果は、イン・ビトロJak1キナーゼ活性検出の不可能性は、Jak2キナーゼ活性検出の能力がEpoによる細胞の刺激に完全に依存しているため、イン・ビボでの適当な活性化の方法がないためであることを示唆している。この点では、Jak1が弱くEpoRと関係し、Epo刺激に続いて弱くチロシンリン酸化をしているように思えるが、本発明者らはJak1イン・ビトロでキナーゼ活性を証明できなかった。

【0123】チロシンリン酸化のイン・ビトロ反応での初期基質はJak2であり、免疫グロブリン重鎖のリン酸化は明確に検出されなかった。Jak2が非常に特異的な基質特異性をもち得ることが示唆された。Jak2活性化の機構に注目すると、リガンド結合は分子内リン酸化開始のようなJak2との関連を促進し、キナーゼ活性を活性化する。次に活性化Jak2は、蛋白チロシンキナーゼ受容体と完全に同じ方法で、イン・ビトロ免疫沈降物でこのような分子内リン酸化を続ける能力をもつ(オーツカラ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)10:1664-1671(1990);ヤーデンおよびシュレッシング、バイオケミストリー(Biochemistry)26:1434-1442(1987))。

【0124】Epo刺激はEpoR受容体の急速チロシンリン酸化をJak2のチロシンリン酸化と同等の動態

で導く。これは、Jak2がEpoRリン酸化に応答可能なキナーゼであることを示唆する。EpoRのリン酸化は膜遠位カルボキシ末端で起こり、そこは分裂促進性には必要でない領域である。このリン酸化は膜基部領域に20アミノ酸欠損を含むまたはこの領域にW²⁸²→R変異を含む変異体では起こらない。これらの変異体の両方がJak2リン酸化およびキナーゼ活性およびイン・ビトロのJak2のEpoRに関連する能力を除去するアミノ酸欠損にまた影響するため、Jak2がEpoRリン酸化に対して応答可能なキナーゼであるように思える。あるいは、他のキナーゼがJak2に関連し得、それにより受容体の領域へ運ばれる。もしそうであれば、この付加的キナーゼはJak2のリン酸化にまた必要であろう。

【0125】Jak2およびEpoRの発現に関しては、チロシンリン酸化を誘導するEpoの基質と比較して比較的僅かしか知られていない。92kDa、70kDaおよび55kDaの基質は本発明者らの研究で矛盾せず検出されており(ミウラら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)11:4895-4902(1991))、他の者も同様の物およびさらなる基質を同定している(ダーメンら、ブロード(Blood)80:1923-1932(1992));ケレおよびウジコスキー、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)266:609-614(1991);ケレら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)267:17055-17060(1992);リンネキンら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)89:6237-6241(1992);ドゥサンターフォルトラ、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)267:10670-10675(1992))。Jak2と共免疫沈降する55および70kDaのチロシンリン酸化を誘導可能な基質が容易に検出可能であることもまた注目に値するほど重要である。本発明者らはvav、rat、GAPおよびSHCを含む多くの潜在的に興味のある基質を除去した。しかしながら、本発明者らは恐らくJak群キナーゼTyk2の基質であり、INFα応答を伴う113および91/84kDaのISGF3α蛋白は試験していない(シュヒンドラーら、サイエンス(Science)257:809-813(1992);フ、X.Y.セル(Cell)70:323-335(1992))。あるいは、Epoに対する応答に関連した遺伝子の転写的活性を特に媒介するJak2と相互作用する近縁の蛋白も存在するかもしれない。

【0126】先の研究では、130kDaリン蛋白がEpoRと関連があることが示された(ヨシムラおよびローディッシュ、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol.Cell.Biol.)12:706-715(19

92)). 架橋により、EpoRと関連するよう見え、IL-3のβ鎖またはGM-CSF受容体またはIL-6受容体のpp130鎖と同等な受容体複合体のサブユニットである可能性が示唆される。しかしながら、これらの蛋白とは異なり、p130はN-グリコシル化されておらず、細胞質蛋白であることを示唆している。p130のチロシンリン酸化は抗ホスホチロシン抗体との免疫沈降により検出された。しかし、チロシンリン酸化はEpoにより誘導されたものであるかは確認できなかった、なぜなら単離に使用した方法はEpoR/p130複合体だからである。それに関係なく、p130の特性はJak2であるとの仮説と矛盾しない。

【0127】本発明者らの結果はJak2チロシンリン酸化および受容体の関連が分裂促進性の本質である膜基部領域を必要とすることを証明する。これはいずれも分裂促進性不活性であり、同時にJak2チロシンリン酸化またはキナーゼ活性の活性化とは組み合わせっていない、欠損変異体(PB)およびW²⁸²→R部分変異体により最も詳しく説明される。しかしながら、20アミノ酸欠損変異体(PB)のみがJak2との物質的関連の能力を欠いている。部分変異がイン・ビボでのEpoRおよびJak2の機能的相互作用を妨害するのに充分であるが、高蛋白濃度ではイン・ビトロでの物質的相互作用の除去するための相互作用の親和性は充分低くはない。

【0128】本発明者らの結果は、Jak2のEpoRへの関連はリガンド結合と無関係であることを示唆する。従って、Jak2リン酸化が受容体/Jak2複合体の効果の変化の結果おこるものであるという仮説を立てることができる。仮説を支持するかなりの証拠があり、それにはEpo結合が2量体化を誘導する、および受容体のオリゴマー化を誘導し、これが受容体機能に重要であることが含まれる(ワトウィッチら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89: 2140-2144 (1992))。これは受容体の構成的活性化の結果である変異体EpoR(R¹⁹⁹→C)の存在により支持される(ヨシムラら、ネイチャー(Nature) 348: 647-649 (1990))。この変異体はシステイン転化を必要とし、リガンドがないときはジスルフィド結合オリゴマーを形成する能力をもつ(ワトウィッチら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89: 2140-2144 (1992))。この変異体を発現する細胞では、Epoがないとき、Jak2キナーゼは構成的にチロシンリン酸化し、イン・ビトロキナーゼ活性をもつ。これらのデータを基に、われわれはEpo結合がEpoR/Jak2複合体のオリゴマー化を起こし、キナーゼ分子を分子内チロシンリン酸化するのに充分近くに運んでくる、という仮説をさらに立てた。このモデルはいくつかの蛋白チロシン

キナーゼ類で提案されているのと類似である(ウルリッチおよびシュレッシングガー、セル(Cell) 61: 203-212 (1990))。

【0129】IFNα受容体を用いる研究は、高親和性結合はTyk2の関与を必要とし得ることを示唆する(フィームバツハークラフトら、オンコジーン(Oncogene) 5: 1329-1336 (1990))。この可能性はEpoRにもまた存在する。特に、Jak2が偏在して現れるため、受容体の結合親和性はJak2がないときは測定できない。さらに、本明細書に記載のように、EpoRはJak2と線維芽細胞に機能的に関連している。従って、Jak2キナーゼを含まず、受容体と充分な相同性がある系統学的に遠い細胞中での受容体の発現が必要である。このような条件下、受容体の親和性にJak2結合を向けることができるであろう。

【0130】Jak群キナーゼは偏在して発現する(ウィルクスら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 11: 2057-2065 (1991); 実施例1もまた参照)。従って、線維芽細胞でEpoRの発現がチロシンリン酸化の活性化と結び付くのに充分か否かを測定することは重要であった。記載したように、EpoRおよびJak2の両方のチロシンリン酸化はEpoの刺激に続いて検出された。使用した細胞の蛋白チロシンリン酸化の高いバックグラウンドのために、本発明者らはEpo刺激が他の細胞性基質のチロシンリン酸化を誘導するか否かを測定できなかった。しかしながら、血清絶食細胞のEpo刺激は分裂促進応答を誘導せず、細胞増殖に結合する結合リガンドとして必要な要素がかけられていることを示唆する。あるいは、恐らく不十分な受容体が発現しているであろう。これに対し、最近の研究(ワタナベら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 13: 1440-1448 (1993))は線維芽細胞の再構成GM-CSF受容体複合体が成長促進信号を伝達できることを証明した。

【0131】Epo受容体の膜基部領域はJak2関連とともに他の造血成長因子受容体と同様な限定配列を含む(ムラカミら、プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 88: 11349-11353 (1991))。試験した全ての場合に、この領域は分裂促進性の本質であることが示される。従って、他の造血サイトカイン受容体スーパーファミリーがJak2、または可能ならキナーゼのJak群の他のものに関連しているか否かを測定するのは重要である。この点から、本発明者らはIL-3、GM-CSFおよびG-CSFがJak2の特異的チロシンリン酸化を誘導することもまた発見した。IL-2、IL-4およびIL-6を含む他のサイトカインに対する応答においてJak群キナーゼの役割を更に調査するうえで、これは重要である

う。

【0132】Jakキナーゼの偏在性発現はさらにサイトカイン受容体スーパーファミリーの他の非造血群と共に分裂促進性に結合するリガンドと結合し得ることを示唆する。その存在はエンドクリン成長ホルモンの細胞外領域、造血サイトカイン受容体と構造的関連があり、およびさらに組織因子およびインターフェロンの受容体の遠位な関係の可能性があることと認識される(バザン, J. F., イムノロジー・トゥデー(Immunol. Today) 10: 350-354 (1991); バザン, J. F., プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87: 6934-6938 (1990); デ・ボスら, サイエンス(Science) 255: 306-312 (1992))。もしこれらの関係が信号受容体の異なる発展を反映したものであれば, Jakキナーゼ群との相互作用を介して同様の方法で信号伝達をつなぐことが可能であろう。従って, INF α 受容体はTyk2を通して連結しており, 一方IL-3, GM-CSF, G-CSFおよびEpoに対する受容体はJak2を通して連結している。これらと一致して, 本発明者らはINF γ がマクロファージ細胞系でJak2のチロシンリン酸化を誘導することを発見した。加えて, 最近の研究で, 成長ホルモン受容体はJak2に結合し, 活性化することが発見された。どのJakキナーゼが他の群のサイトカイン受容体スーパーファミリーと関係し活性化するか同定することは相当興味深い。

【0133】キナーゼのJak群が同様の機構で遺伝子制御に影響しているか否かを同定するのもまた興味深い。かなりの証拠が, Tyk2が, ISGF3 α (インターフェロン刺激遺伝子因子3)複合体の113kDaおよび91/84kDa蛋白のチロシンリン酸化に関連したINF α/β とつながっていることを示唆している(フ, X. Y., セル(Cell) 70: 323-335 (1992))。リン酸化の後, この複合体が48kDaのISGF3 γ 蛋白と結合し, 複合体はインターフェロン刺激反応因子が結合している核へ移動し, 遺伝子発現を活性化する。最近の研究(シュアイら, サイエンス(Science) 259: 1808-1812 (1992))は, INF γ がまた91kDa蛋白のリン酸化を誘導するが, 113kDa蛋白のリン酸化は誘導せず, 従って, 核へ移動し, γ -活性部位へ結合することを証明した。上記に記載したように, Jak2は, INF γ 結合に続いてチロシンリン酸化を誘導し, 従ってキナーゼが関連している。もし正しければ, Epo, IL-3, GM-CSFまたはG-CSFによる細胞の刺激は91kDaのISGF3 γ 蛋白またはこの遺伝子群のチロシンリン酸化をする。この点から, EpoまたはIL-3に対する応答により見られるチロシンリン酸化の主要な基質の1つは約92kDaの蛋白である(ミウラら, モレキュラー・アンド

・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 11: 4895-4902 (1991); ミウラら, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 13: 1788-1795 (1993))。上記より, サイトカイン受容体スーパーファミリー群は, リガンド結合の遺伝子発現の誘導とを関連させているとの仮説, すなわち, 部分的には, リガンド結合後の自己リン酸化によりJakファミリーのキナーゼが活性化され, 次いで, ICSP, IRF-1, IRF-2およびc-myb [ベアルスら, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 12: 3315-3324 (1992)] を含むISGF3 α 群DNA結合蛋白と次々に結合するISGF3 γ 群のリン酸化を引き起こすことにより, サイトカイン受容体スーパーファミリー群は, リガンド結合の遺伝子発現の誘導とを関連させていると仮説することができる。

【0134】実験方法

細胞ラインおよび培養条件

野生型受容体を発現するDA3(EpoR)細胞および様々な突然変異体を発現するDA3細胞を前記したように5mMグルタミン, 10%FCS, 1U/ml EpoおよびG418を追加したRPMI-1640で保存した(ミウラ等, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 11巻, 4895-4902頁(1991年))。PBSで細胞を3回洗浄し, 5mMグルタミン, および10%FCSを追加したRPMI-1640中で成長因子無しで12ないし16時間インキュベートすることにより細胞を飢餓させた。細胞を10-30U/ml Epoで刺激した。

【0135】試薬

Jak1およびJak2由来のペプチドに対するウサギボリクローナル抗血清の調製および特性については, 実施例1に記載している。c-fesに対する抗血清は, J. ダウニング(セント・ユダ・チルドレンズ・リサーチ・ホスピタル, メンフィス)により好意的に提供されており, その特性はすでに記載されている(ハインズおよびダウニング, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 8巻, 2419-2427頁(1991年))。lynに対する抗血清も記載されている(イー等, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 11巻, 2391-2398頁(1991年))。ハツカネズミTecに対する抗血清は, GST-融合蛋白質に対して調製されており, Tec発現細胞由来であるが対照細胞由来でない70kDa蛋白質を特異的に免疫沈降する。抗ホスホチロシンモノクローナル抗体としては, 市販の4G10(UBI), 1G2(オンコジーン・サイエンシズ(Oncogene Sciences))およびPY20(ICN)などであった。ヒトEpoはアムゲンから提供された。

【0136】pXM EpoRの3T3細胞へのトランス

フュージョン

プラスミド pXM EpoR (D'アンドレア等、セル (Cell)、57巻、277-285頁 (1989年)) を 3T3 繊維芽細胞へ前記したように電気穿孔法によりトランスフェクションした (ミウラ等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)、11巻、4895-4902頁 (1991年))。その細胞をデルベッコの修飾イーグル培地 (DMEM) 中で 10% FCS と共に保存した。実験では、その細胞を 0.5% FCS を含有する培地で一晩培養することにより、生育因子を飢餓させた。その細胞を引き続き同じ培地中 Epo (3 U/ml) で刺激した。

【0137】融合遺伝子の構造

調製した細菌発現性融合蛋白質は、アミノ末端グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) ドメインおよびハツカネズミ EpoR 細胞質ドメインのカルボキシル部分を含有する。EpoR 細胞質ドメインの全長 (257-483 アミノ酸) を含有する構築物は、EpoR cDNA の平滑末端 BgIII-KpnI フラグメントを pGEX-2T の SmaI 部位に挿入することにより調製する。EpoR の膜隣接細胞質ドメイン (257-375 アミノ酸) を含有する構築物は、EpoR cDNA の平滑末端 BgIII-HindIII フラグメントを pGEX-2T の SmaI 部位に挿入することにより得られる。同一の構築物を前記した PB および PM-4 突然変異体を含有する EpoR cDNA を用いて調製する (ミウラ等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)、11巻、4895-4902頁 (1991年))。次に、融合蛋白質をプラスミド構築物で形質転換した E. coli 株 DH5- α から得、前記したようにグルタチオン-S-セファロース (ファルマシア) によりアフィニティー精製した (スミスおよびジョンソン、ジーン (Gene)、67巻、31-40頁 (1988年))。

【0138】融合蛋白質結合アッセイ (検定)

成長因子刺激に続いて、細胞を溶解緩衝液 (1% トリトン X-100、50 mM NaCl、30 mM Na₂P₂O₇、50 mM NaF、0.1 mM Na₃VO₄、5 mM EDTA、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.05 mg/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、10 mM トリス、pH 7.6) 中 5×10^7 細胞/ml で溶解した。溶解物から 10 分間 12,000 g で細胞の破片を取り除き、引き続き、グルタチオン-S-セファロースで固定化した GST-EpoR 融合蛋白質と共にインキュベートした。樹脂を BSA を除いた溶解緩衝液で十分に洗浄し、次に結合した蛋白質を SDS-PAGE にかけるために試料緩衝液で溶出した。溶出した蛋白質を 8% SDS-PAGE ゲルで切り離し、様々な抗血清でイムノプロットした。

【0139】イン・ビトロでのキナーゼアッセイ

蛋白質 A-セファロース (ファルマシア) で免疫沈降した蛋白質をキナーゼ緩衝液 (50 mM NaCl、5 mM Mg

Cl₂、5 mM MnCl₂、0.1 mM Na₃VO₄、10 mM HEPES、pH 7.4) で洗浄し、引き続き 0.25 M Ci/ml ³²P- γ -ATP を含有する等容量のキナーゼ緩衝液を用い、30 分間室温でインキュベートした。十分洗浄した後、蛋白質を SDS-PAGE にかけるため試料緩衝液で溶出し、7% ゲル上で切り離した。³²P-含有蛋白質をオートラジオグラフィーで明視化した。イン・ビトロでリン酸化した Jak2 をゲル薄片から分離し、ホスホアミノ酸含量を公表されている方法 (クーパー等、メソッズ・エンザイモロジー (Methods Enzymol.)、99巻、387-402頁 (1983年)) で測定した。

【0140】免疫沈降、SDS-PAGE およびウェスタンブロットニング

細胞を収穫し、氷冷溶解緩衝液 (50 mM) トリス-HCl (pH 7.5) 1 ml、150 mM NaCl、1% (容量/容量) トリトン X100、100 μ M バナジウム酸ナトリウム、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、および 1 mM EDTA 中で 20 分間溶解した。溶解物を 4℃ で 30 分間遠心分離にかけて前もって透明 (プレクリアー) にした。上清を除去し、プレ免疫血清および蛋白質 A-セファロース (50% スラリー 40 μ l) と共に 1 時間インキュベートした。次に、指定の血清またはモノクローナル抗体を加え、4℃ で 1-2 時間インキュベートした。必要ならば蛋白質 A-セファロース (50% スラリー 40 μ l) を加え、免疫沈降物を 3 回、冷溶解緩衝液 1 ml で洗浄し、ラメリの試料緩衝液 10% (容量/容量) グリセロール、1 mM DTT、1% (重量/容量) SDS、50 mM トリス-HCl (pH 6.8) および 0.002% (重量/容量) プロモフェノールブルーに再懸濁し、7.5% SDS-PAGE にかけた。次に、ゲルを電気泳動的にニトロセルロースに移した。そのフィルターをプロット (TBSS 中 5% 脱水ミルク、10 mM トリス-HCl pH 7.6 および 137 mM NaCl) 中で 2 時間インキュベートし、次に適切な主たる抗体中で 1 時間インキュベートし、TBSS でリンスし、西洋ワサビペルオキシダーゼ (アメルシャム) または抗マウスまたは抗ウサギ結合 (コンジュゲート) アルカリホスファターゼ (プロメガ) 中で 1 時間インキュベートした。そのフィルターを次に洗浄し、ECL™ (アメルシャム・ライフ・サイエンス) または 5-ブローモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート/ニトロブルー-四ナトリウム検出にかける。引き続き ECL 検出をコダック XAR-5 フィルムに記録した。混合物を細胞溶解物に加える前、またはウェスタンブロットニングのために溶液を希釈する前に、合成ペプチドを用いた比較研究を 4℃ で 1 時間、ペプチド 100 μ g/ml と共に抗血清をインキュベートすることにより行った。

【0141】実施例 3: 成長ホルモン受容体と結合したチロシンキナーゼとしての Jak2 の同定
要約

成長ホルモン受容体 (GHR) は、チロシンキナーゼと複合体 (complex) を形成し、成長ホルモン (GH) による細胞内シグナル発信時にリガンド-活性化チロシンキナーゼと関係することを暗示している。ここで、GHR-結合チロシンキナーゼとしての Jak 2、即ち非受容体チロシンキナーゼを同定する。免疫学的アプローチを用いて、Jak 2 および GHR 間の GH-依存性複合体形成、Jak 2 チロシンキナーゼ活性の活性化、および Jak 2 および GHR 両方のチロシルリン酸化を確認した。ここに記載および実施例 2 に付随して記載した Jak 2-GHR および Jak 2-エリトロポエチン受容体相互作用は、これらのリガンドに対する生理学的応答時のチロシルリン酸化の役割に対する分子基礎を与えるものであり、これにより、サイトカイン/ヘマトポエチン受容体ファミリー (族) 間で分配されるシグナル発信機構を証明するものである。

【0142】序文

成長ホルモン (GH) の成長促進、および代謝調節の能力は、何年も前から知られている (チーク, D. B. およびヒル, D. E., "細胞および身体成長における成長ホルモンの効果", E. ノブリおよび W. H. ソーヤー出版、ハンドブック・オブ・フィジオロジー、4巻、159-185頁、ワシントン, DC (1974年); ダビッドソン, M. B., レビュー (Rev.), 8巻、115-131頁 (1987年)) が、GH がその受容体に結合し、その多様な応答を導き出す分子機構については、謎が残ったままである。最近、チロシンキナーゼ活性が GH 処理繊維芽細胞から調製される GH 受容体 (GHR) との複合体に存在することを証明することにより GH シグナル発信機構についての新しい眼識が与えられた (カーター-Su., C. 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264巻、18654-18661頁 (1989年); ストレッド, S. E. 等、エンドクリノロジー (Endocrinology), 130巻、1626-1636頁 (1992年); ワング, X. 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻、17390-17396頁 (1992年))。3T3-F442A 細胞についての更なる研究は、GHR 結合チロシンキナーゼの阻害によりこれらの作用を阻害するのと同様、多彩な蛋白質の迅速な GH-依存性チロシルリン酸化、微小管結合蛋白質キナーゼのチロシルリン酸化、および微小管結合蛋白質キナーゼ活性の刺激を示しており (キャンベル, G. S. 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 268巻、7427-7434頁 (1993年))、GH によるシグナル発信時の GHR 結合チロシンキナーゼの中心的役割を提案している。最近、非受容体チロシルリン酸化 122 kd 蛋白質をキナーゼ活性 GH-GHR 調製時に同定した (ワング, X. 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 268巻、3573-3579頁 (1993年))。自動リン酸化が活性化キナーゼの現れである

ことがしばしばあるため、122 kd リン蛋白質が GHR 結合キナーゼであるとの仮説が設けられた。

【0143】本研究では、GHR 結合キナーゼとして Jak 2 すなわち 130 kd チロシンキナーゼ (ハーバー, A. G. 等、オンコジーン (Oncogene)、7巻、1347-1553頁 (1992年)) を同定した。Jak 2 は、Jak 1、Jak 2 および Tyk 2 を含むチロシンキナーゼの最近の表現であるヤヌス族 (Janes family) のメンバー (1員) である。キナーゼドメインを持つことに加えて、これらの蛋白質は、第二のキナーゼ様ドメインの存在および Src ホモロジー 2 (SH2)、SH3 および膜スパンニング (membrane-spanning) ドメインの不在で特徴付けられる (ウィルクス, A. F. 等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 11巻、2057-2065頁 (1991年); ファームバツハークラフト, I. 等、オンコジーン (Oncogene)、5巻、1329-1336頁 (1990年); ハーバー, A. G. 等、オンコジーン (Oncogene)、7巻、1347-1553頁 (1992年))。

【0144】ここで GH 結合は、Jak 2 と GHR の結合、Jak 2 の活性化、および Jak 2 および GHR 両方のチロシルリン酸化を促進することを示す。GHR シグナル導入経路における初期のシグナル発信分子としての Jak 2 の同定は、GHR によるシグナル発信および Jak 2 の機能の重要な洞察を提供するものである。実施例 2 に付随して在る研究は、Jak 2 がエリトロポエチン (Epo) の受容体とも結合することを示唆しており、他のデータは、サイトカイン/ヘマトポエチン受容体族の他の一員の少なくとも 4 種 (インターロイキン [IL]-3、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 [GM-CSF]、顆粒球コロニー刺激因子 [G-CSF] およびプロラクチンの受容体)、および IFN- γ 受容体とより遠縁に関係するものが Jak 2 を活性化することを示唆している (付随する実施例を参照)。それゆえに、ここに示された Jak 2-GHR および Jak 2-Epo 受容体相互作用が、この大きい受容体超科 (superfamily) の多くによるシグナル発信の原型として働くと思われる。

【0145】結果

GH は Jak 2 のチロシルリン酸化を刺激する
GHR 結合チロシンキナーゼの存在を確認する先行研究 (カーター-Su., C. 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264巻、18654-18661頁 (1989年); ストレッド, S. E. 等、エンドクリノロジー (Endocrinology), 130巻、1626-1636頁 (1992年); ワング, X. 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 268巻、3573-3579頁 (1993年); キャンベル, G. S. 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 268巻、7427-7434頁 (1993年)) に基づき、GHR 関連チロシンキナーゼは、第 1 に 120 kd の蛋白質であること、第 2 に GH への応答時にチロシルリン酸化

されること、第3にGHRとの複合体で存在すること、第4にGHに体する応答時に活性の増加が見られることが期待されるであろう。

【0146】Jak2は、GHR結合キナーゼであるために正確なサイズ(M_r 130,000、実施例1参照)のチロシンキナーゼであり、それゆえに、GHへの応答時にリン酸化されるその能力を試験した。GH処理3T3-F442A繊維芽細胞由来の可溶性蛋白質をJak2に対する抗血清(αJak2)を用いて免疫沈降させ、抗ホスホチロシン抗体(αPY)イムノプロットにより分析した。細胞を0.5ng/mlから500ng/ml(標準濃度を用いた)の10倍増加の範囲のGHの様々な生理学的濃度で0、0.5、5、50および60分間インキュベートした。

【0147】Jak2に適切なM_r(130,000)を持つ蛋白質のGH依存性チロシルリン酸化は、30秒程の早期に5.0ng/ml(230pM)程の低いGH生理学的濃度で、非常に顕著であった。リン酸化は瞬間的であり、GH添加後、60分までに大きく減少する。130kdリン蛋白質をαJak2免疫沈降物のαPY免疫芽細胞で検出した。この130kd蛋白質の出現は、時間経過に対応しており、細胞全体の溶解物中のチロシルリン酸化蛋白質の出現を伴うGH投与量応答は、前研究においてpp121を明示した(キャンベル、G.S.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、268巻、7427-7434頁(1993年);ワング、X.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、268巻、3573-3579頁(1993年))。これら2種の蛋白質の同定は、チロシルリン酸化pp121およびJak2が細胞溶解物中で共同移動し、αJak2での免疫沈降の結果細胞溶解物由来のチロシルリン酸化pp121が消耗することにより提示される。

【0148】130kdリン蛋白質をαJak2で特異的に沈降させる。ペプチドで予め吸着させた非免疫血清、関係の無い免疫血清(αGLUT-1)、およびαJak2をpp130を免疫沈降しない抗体を作成するのに使用した。ハツカネズミJak1(実施例1参照)由来の類似ペプチドを用いるαJak2を予め吸着しても、αJak2による130kdリン蛋白質の沈降を抵触しなかった。αJak2を用いるこれらの結果とは対照的に、それぞれJak1(αJak1)およびTyk2(αTyk2)に特異的な抗体で免疫沈降する3T3-F442AおよびIM-9細胞溶解物は、それぞれの細胞型でこれらのキナーゼが存在するにもかかわらず、130kd蛋白質のGH依存性チロシルリン酸化を殆ど(αJak1の場合)または全く(αTyk2の場合)現さなかった。

【0149】αJak2による3T3-F442A細胞から沈降した130kd蛋白質のチロシルリン酸化は、GHにより特異的に増加した。リン酸化は、血小板由来増殖因子、上皮増殖因子またはインシュリン様増殖因子1によ

っては増加しなかった。これらの増殖因子は、それらの受容体に本来備わっているチロシンキナーゼ活性を刺激し(アルリッチ、A.およびシュレシナー、J.、セル(Cell)、61巻、203-212頁(1990年))、3T3-F442A繊維芽細胞における多彩な蛋白質のチロシルリン酸化を促進する(キャンベル、G.S.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、268巻、7427-7434頁(1993年))。Jak2チロシルリン酸化を刺激する能力の欠如は、前記したこれらの増殖因子の細胞全体溶解物中のpp121のチロシルリン酸化を刺激する能力の欠如と一致する。

【0150】Jak2はGH受容体と結合するJak2がGHR、GH-GHR複合体および結合する蛋白質と複合体を形成するかどうかを測定するのに、GHに対する抗体(αGH)を用いる可溶性、GH処理3T3-F442A繊維芽細胞から免疫沈降させた。αGH免疫沈降物中のJak2の存在を、αJak2でのイムノプロット、またはαJak2での免疫沈降およびαPYでのイムノプロット、またはαJak2での免疫沈降およびαPYでのイムノプロット、またはαJak2での免疫沈降およびαPYでのイムノプロットのいずれかにより明らかにした。αGHを用いて沈降した物質を分析する場合、αJak2は、130kd蛋白質をイムノプロットし、およびαJak2により認識される蛋白質と共に共同移動するチロシルリン酸化130kd蛋白質を免疫沈降することを見だし、これはJak2がGH-GHR複合体と結合することを示すものであった。αGHの代わりに、最初の免疫沈降をGHRの細胞質または細胞外ドメインのいずれかに対する抗体(αGHR)を用いて行った場合、αJak2は、細胞をGHと共にインキュベートした場合のみ130kd蛋白質を認識した。GH結合GHRとJak2が結合するため、αGHR沈降物中のJak2の存在には矛盾がなく、αGH免疫沈降物のαJak2イムノプロットにおいて、細胞をGHと共にインキュベートしなかった場合、または免疫沈降を関連のない免疫血清(αGLUT-1)を用いて行った場合のいずれにおいても何等シグナルは検出されなかった。これらの結果より、自身の受容体と結合するGHは、GHRとJak2の複合体形成に必要であるという証拠を提供する。

【0151】Jak2であると思われる130kdリン蛋白質に加えて、αPYイムノプロットにより同定された広範囲に移動する120kdのリン蛋白質は、αGH、αGHR、およびより低い程度ではαJak2により沈降した。この広がったバンドはGHRであると一致しており、そのサイズは、これら細胞中のGHRについて既に報告したもの(シュワルツ、J.およびカーター-Su、C.、エンドクリノロジー(Endocrinology)、122巻、2247-2256頁(1988年);ストレッド、S.E.等、エンドクリノロジー(Endocrinol.)、130巻、1626-1636頁(1992年))に対応しており、αGH免疫沈降物のウェスタンブロットにおいて、αGHRにより同定された120kdバンドと類似の広がり度で共同移動する。チロシ

ル残基が、細胞をGHと共にインキュベートした場合のみ、 α GHR免疫沈降物中に存在する広範な120kd蛋白質中でリン酸化されるという研究成果により、Jak2のチロシルリン酸化に似たGHRのチロシルリン酸化がGH依存性であるという証拠を与える。Jak2およびGHRのいずれもがGHにตอบสนองしてチロシルリン酸化される更なる証拠は、より小さいGHR(84kd)を発現するトランスフェクションされたチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞ライン(CHO4)(エミナー、M.等、モレキュラー・エンドクリノロジー(Mol.Endocrinol.)、4巻、2014-2020頁(1990年);ワング、X.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、268巻、3573-3579頁(1993年))において、 α GH、 α GHRおよび α Jak2免疫沈降物中130kd蛋白質のチロシルリン酸化、および α GHおよび α GHR免疫沈降物中の広範囲に移行する84kd蛋白質は、GH依存性であるとの発見により提供される。

【0152】Jakキナーゼ活性のGHによる刺激

先の研究では、 α GH沈降物をGH処理CHO4細胞から調製する場合、ATPを加えると130kdおよび84kd蛋白質の両方のチロシルリン酸化を生じることを確認していた(ワング、X.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、268巻、3573-3579頁(1993年))。このイン・ビトロのキナーゼアッセーにおいてリン酸化された130kdおよび84kd蛋白質が、それぞれJak2およびGHRであるかどうかを測定するには、GH-GHR複合体および結合した蛋白質を α GHを用いて、GH処理および対照CHO4細胞から沈降させ、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPと共にインキュベートし、SDS、 β -メルカプトエタノールおよびジチオトレイトール(DTT)を含有する緩衝液中で煮沸して解離し、 α Jak2または α GHRのいずれかを用いて沈降させる。本実験では、 α Jak2はJak2に適切な130kdの ^{32}P -標識蛋白質を沈降させることが出来、 α GHRはGHRに適切な84kdの ^{32}P -標識蛋白質を沈降させることが出来、Jak2およびGHRのいずれもがイン・ビトロのキナーゼアッセーにおいて ^{32}P を取り込むことを示している。

【0153】Jak2がGH依存性チロシンキナーゼとして機能することを立証するため、Jak2を α Jak2での直接的免疫沈降、またはより高度に精製させるために、 α PY続いて α Jak2を用いる一連の免疫沈降のいずれかによりGH処理および対照3T3-F442A細胞から精製した。その後、 α Jak2免疫複合体を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPでインキュベートした。細胞をGHと共にインキュベートした場合のみ、Jak2に適切なMr(130,000)を有して移動する ^{32}P -標識蛋白質を検出し、これはGHによる活性化に対する鋭敏なJak2の感受性を示している。Jak2がチロシル残基にホスフェートを取り込むことを立証するために、GH処理3T3-F442A細胞

から分離した ^{32}P -標識130kd蛋白質でホスホアミノ酸分析を行った。 ^{32}P は、殆ど独占的にチロシル残基に取り込まれ、Jak2がGH感受性チロシンキナーゼであることに矛盾しないことを見いだした。しかしながら、 α Jak2免疫沈降物中のスレオニン残基に取り込まれた少量の ^{32}P (1%以下)は、Jak2がスレオニン/セリン/チロシンキナーゼの混合機能である可能性を未解決に残している。

【0154】考察

GHRに対するシグナル発信分子としてのJak2の同定GH依存性、GHR結合チロシンキナーゼとしてのJak2の同定は、GHRおよびJak2の両方によるシグナル導入に対して重要な意味をもつものである。GHRに関して、Jak2をGHRと相互作用するシグナル発信分子として同定し、GH結合への応答時に活性化する。GHに対するその感受性およびGH添加に従う素早い攻撃は、Jak2のチロシルリン酸化を為す。GHについて知られている最も感受性で素早い応答の中でも、Jak2のチロシルリン酸化を為す。即ちJak2の活性化は、GHシグナル導入の初期段階である。

【0155】チロシンキナーゼは、代謝応答(例えば、インシュリン受容体)および分化(例えば、神経成長因子受容体)を含むGHに起因すると類似の応答を顕在化することが示されて来た(ダビッドソン、M.B.による概説、レビュー(Rev.)、8巻、115-131頁(1987年);アイザックソン、O.G.P.等、エンドクリノロジー(Endocrinol.)、レビュー(Rev.)、8巻、426-438頁(1987年);レビーモンタイチーニ、R.、サイエンス(Science)、237巻、1154-1162頁(1987年);カプラン、D.R.等、サイエンス(Science)、252巻、554-558頁(1991年))。それゆえに、Jak2は、GHに対する既知の応答を引き起こすのに極めて重大な役割を演じる。これに一致するように、GHの結合以上の生物学的な機能は、低レベルのGHR結合チロシンキナーゼ活性を有する細胞中で発現されるGHRについて、報告されていない(例えば、COS-7およびマウスL細胞;ロイング、D.W.等、ネイチャー(Nature)、330巻、537-543頁(1987年);ワング、X.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、267巻、17390-17396頁(1992年))。反対に、様々な生物学的機能(例えば、RIN5-AH細胞でのインシュリン合成および蛋白質合成、微小管結合蛋白質キナーゼ活性、c-fos遺伝子発現、およびチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞での脂質合成)は、クローン化肝臓GHRが高レベルのGHR結合キナーゼ活性を適度に有する細胞中で発現する場合、GH結合によって活性化され得る(ピトルストラップ、N.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・USA(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)、87巻、7210-7214頁、(1990年);エミナー、M.等、モレキュラー・エンドク

リノロジー (Mol. Endocrinol.), 4巻, 2014-2020頁 (1990年); モラー, C. 等, 成長ホルモン作用機構の態様, Ph. 博士論文, キャロリンスカ・インスティテュート (Karolinska Institute), NO-VUM, ハディング (Huddinge), スウェーデン (1992年), 1-9頁; ワング, X. 等, ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 17390-17396頁 (1992年); モラー, C. 等, ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 23403-23408頁 (1992年)).

【0156】更に, 3T3-F442A細胞中で, 多彩な蛋白質がチロシルリン酸化においてGH依存性増加を示す。Jak2の活性がこれらのリン酸化に要求されているのに一致して, Jak2/p p121のチロシルリン酸化は, 試験した全てのGH濃度で, GH依存性チロシルリン酸化を示す全ての蛋白質のチロシルリン酸化と同時に起こるか, または先に起こる (本発明およびキャンベル, G. S. 等, ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 268巻, 7427-7434頁 (1993年))。

【0157】Jak2は, 他の蛋白質をリン酸化することにより, GHRに対するシグナル発信分子として働く。2種の蛋白質がJak2の基質として同定された。即ち, Jak2自身とGHRである。

【0158】先端を切ったGHRを用いる研究では, GHRの細胞質ドメインにおいて, 膜に最も近接する4種のチロシル残基の少なくとも1種をGHへの対応時にリン酸化することを示唆している。それ自身リン酸化されることもあるGHRのC末端部分でチロシンを同定すると同様, Jak2によりリン酸化される4種のチロシンを同定するために, 複数の研究が進行中である。Jak2およびGHRでのチロシルリン酸化の同一性と数を決定することは重要である。何故ならば, これらの部位は, 細胞内シグナル発信経路において, SH2含有蛋白質 (例えば, ホスホリパーゼC- γ , p85ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ, およびGTPアーゼ活性化蛋白質; コッホ, A. A. 等, サイエンス (Science), 252巻, 668-674頁 (1991年)) に対する結合部位であると思われるからである。リン酸化Jak2に結合するSH2含有蛋白質を伴うシグナル発信経路は, Jak2を活性化

【0159】Jak2もまた以下のEpoとその受容体との結合を活性化することが示されている (実施例2)。他のデータは, IL-3, GM-CSF, G-CSF, IFN- γ およびプロラクチンもまたJak2を活性化することを示唆している (実施例1参照)。このように, J

ak2は, サイトカイン/ヘマトポエチン受容体族の多彩な一員に対するキナーゼとして働く。各リガンドが別々の応答型を引き起こすため, キナーゼ活性化だけでは特異性を説明できない。上記のように, 受容体のリン酸化に依存する一連の応答は, 特異性を与えることが出来た。加えて, 特異性は, 多彩なシグナル発信経路間の相互作用, または特定の細胞型における1種の受容体型のみの発現により得ることが出来た。この後者の機構は, GH, G-CSFおよびEpoの持つ能力により, 適切な受容体由来のcDNAでトランスフェクションされたIL-3依存性細胞の増幅を刺激するものであると提案される (フクナガ, R. 等, ヨーロピアン・モレキュラー・バイロジー・オーガニゼーション・ジャーナル (EMBO J.), 10巻, 2855-2865頁 (1991年); イシザカ, イケダ, E. 等, プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 90巻, 123-127頁 (1993年); ヨシムラ, A. 等, プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4139-4133頁 (1990年))。

【0160】Jak2活性化の共通性 (Commonality) は, Jak2共役受容体に結合するリガンドにより活性化される経路を分け合うことがあると暗示するものである。GHによる遺伝子転写調整に関する洞察を得るための特別な対象となるのは, IFN- γ により開始される経路である。IFN- γ に対する応答時に, ISGF-3 (IFN刺激遺伝子因子3) 複合体の91kd蛋白質は, チロシルリン酸化を受け, 次に核に移動し, そこで γ -活性化部位でDNAに結合する (シュアイ, K. 等, サイエンス (Science), 258巻, 1808-1812頁 (1992年))。GHに対する応答時にリン酸化される90kd蛋白質をISGF-3複合体または一族員の91kd蛋白質として同定することは, GHが遺伝子転写において何らかの効果を引き起こし得る一経路を当然意味するであろう。

【0161】GHによるJak2の活性化
GHがJak2を活性化する確かな機構は, まだ知られていない。外来性基質 (ポリGlu, Tyr) を用いる初期の研究では, GHRをGH処理細胞から調製する場合, 対照細胞から調製する場合よりも高いチロシンキナーゼ活性がGHRとの複合体中に存在することを確認した (ストレッド, S. E. 等, エンドクリノロジー (Endocrinology), 130巻, 1626-1636頁 (1992年))。本研究は, このGHが引き起こすキナーゼ活性の増加は, Jak2に対するGHRの親和性の増加およびJak2活性の増加のいずれもから生じることを提案するものである。高精製キナーゼ活性GH-GHR複合体をGH処理³⁵S-標識3T3-F442A繊維芽細胞から α PY, 次に α GHRまたは α GHのいずれかを用いる一連の免疫沈降により分離する場合, Jak2およびGHRに適切なサイズで移動する2種の蛋白質のみが明視化することから, Jak2が

直接GHRに結合するのは明らかである(ストレッド, S.E.等、エンドクリノロジー(Endocrinol.)、130巻、1626-1636頁(1992年))。GHが引き起こす細胞性蛋白質のチロシルリン酸化が、GHRの二量化を必要とするのが明らかであることから、GHがJak2とGHRの結合およびJak2活性化を促進する機構は、GHRの二量化を必要とすると思われる(シルバ, C.M.等、エンドクリノロジー(Endocrinol.)、32巻、101-108頁(1993年))。Jak2経由のシグナル発信における受容体二量化の重要な役割を、更に実施例2に記載したJak2活性化のEpo受容体二量化に関する実験により提案する。

【0162】ここに報告した結果より、GHRによるGHの結合が結果としてJak2に結合する能力を有するリガンド結合GHR二量体の形成を生じるという証拠を提供する。Jak2の補充は、GH-GHR-Jak2複合体の形成、Jak2チロシンキナーゼ活性の刺激、およびJak2、GHRおよびおそらく他の蛋白質のチロシルリン酸化を導き出す。活性化Jak2がGHRとの複合体にのみ存在するのか、またはGHRおよびGHRから物理的に離れたリン酸化タンパク質を分離し得るのかどうかは、現在研究中である。研究下でも、GHRがキナーゼ以外またはそれに加えてJak2と複合体を形成し得ることは可能である。明らかに候補となるキナーゼは、Jak族の他の一員を含んでいる。3T3-F442AおよびIM-9細胞では、それぞれJak1およびTyk2は、Jak2と同程度にGHRと結合するかは明らかではない。しかしながら、これら、またはまだ未同定の他のJakキナーゼは、他の細胞型または異なる生理学的条件では、Jak2と同程度にGHRと結合する可能性がある。

【0163】要約すると、ここに示した実験は、実施例2に示したEpo受容体およびIL-3、GM-CSF、G-CSF、プロラクチンおよびIFN- γ (実施例1参照)の他の受容体についての類似的研究成果を組み合わせ、GHおよびEpoによるJak2キナーゼ活性の活性化が、Jak2受容体複合体を伴う機構であり、サイトカイン/ヘマトポエチン族受容体の多くの一員によるシグナル発信の原型であることを示唆している。GHRが重要でかつ初期のシグナル発信分子をサイトカイン/ヘマトポエチン受容体族の他の一員と分け合うという研究成果は、GH、IL-3、Epo、プロラクチン、GM-CSF、G-CSF、およびIFN- γ がシグナル発信経路を幾らか分け合うことを提案するものである。しかしながら、各受容体のリン酸化が各リガンドに独特のシグナル発信能力を提供することから、依然、特異性が達成され得ることもある。個々の受容体の変異性発現、異なる細胞型で起こり得る全てのシグナル発信経路の1サブセットのみの潜在的な存在、および他の刺激によるこれらの経路でのシグナル発信分子の調整は、付加的レベルの特異性を認めるものである。この研究成果は、他のサ

イトカインの作用と同様にGHの新しい作用の同定を導き出すと思われる。

【0164】実験方法

材料

3T3-F442AおよびCHO4細胞は、それぞれH.グリーン(マサチューセッツ州、ケンブリッジ、ハーバード大学)およびG.ノルシュテット(スウェーデン、ノブム(Novum)、キヤロリンスカ・インスティテュート)の好意によりその持ち合わせを頂いた。組換えヒトGH(hGH)は、イーライ・リリー社より提供された。血小板誘導成長因子(組換えヒトBB)および組換え表皮性成長因子は、カラボレイティブ・リサーチ社から得た。組換えインシュリン様成長因子1は、カビ・ファルマシア社より頂いた。トリトンX-100(Surfact-Amps X-100)は、ピラス・ケミカル・カンパニー、アプロチニンおよびロイペプチンはベーリンガー・マンハイム、組換え蛋白質A-アガロースは、レプリガン、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (6000Ci/mmol)は、ニュー・イングランド・ニュークリア・コーポレーション、および増強化学ルミネセンス検出系は、アメルシャム・コーポレーションから得た。

【0165】抗体

αGH (NIDDK-抗-hGH-1C3、C11981ロット)は、バルチモアのメリーランド大学および医薬学校のナショナル・インスティテュート・オブ・ディabetes・アンド・ディゲスティブ・アンド・キッドニー・ディシーズ/ナショナル・ホルモン・アンド・ピチユイタリー・プログラム(National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases/National Hormone and Pituitary Program)から得た。 αPY -シェイファーは、J.A.シェイファー博士(ペンシルバニア州、ウエスト・ポイントのメルク、シャープ、およびドーム・リサーチ・ラボラトリー;パン、D.T.等、アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Arch.Biochem.Biophys.)、242巻、176-186頁(1985年))から頂き、 αPY -41G10はUBIから購入した。 αJak2 をハツカネズミJak2のドメイン1および2の間のヒンジ部位に対応する合成ペプチドに対抗してウサギで調製した(758-776アミノ酸(SEQ ID No.5)、実施例1参照)。 αJak1 をハツカネズミJak1の対応する領域の合成ペプチドに対抗して調製した(786-804アミノ酸;実施例1参照)。 αGHR 1種(αGHR -C1)をクロン化マウス肝臓GHRの細胞質ドメインに融合したグルタチオンS-トランスフェラーゼから成る融合蛋白質に対抗してウサギで調製し、固定化GHR細胞質ドメインを用いて親和性精製した。W.R.バウムバッハ博士(ニュージャージー州、プリンストンのアメリカン・シアナミド)により好意的に提供された二番目の αGHR (αGHB ペポリ)をエシエリヒア・コリ中で産生する組換えラットGH結合蛋白質を用いてウサギで産生し

た(サデヒ, H.等、モレキュラー・オブ・エンドクリノロジー (Mol. Endocrinol.), 4巻、1799-1805頁 (1990年))。αTyk2は、J. J. クロロウスキ博士 (ニューヨーク州、コロンビア大学) から頂いた。αGLUT-1はヒト赤血球から精製したバンド4.5を用いてウサギで調製した。それは、ヒトおよび齧歯動物のGLUT-1のいずれをも認識する(タル, P. K.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 265巻、21828-21834頁 (1990年))。

【0166】免疫沈降およびウエスタン・ブロッティング

細胞を集密的になるまで生育させ、前記した様に一晚、血清から取り出した(ワング, X.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 268巻、3573-3579頁 (1993年))。細胞を指定したように37℃で空気95%、CO₂5%中で、指定時間ホルモンまたは成長因子と共にインキュベートし、氷冷10mMリン酸ナトリウム(pH7.4)、137mMNaCl、1mMNa₃VO₄の三段階でリンスし、氷上、溶解緩衝液(50mMトリス(pH7.5)、0.1%トリトンX-100、137mMNaCl、2mMEGTA、1mMNa₃VO₄、1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、10μg/mlアプロチニン、および10μg/mlロイペプチン)にこすりつけた。細胞溶解物を12,000xgで10分間遠心分離にかけ、生じた上清を指定の抗体と共に氷上90分インキュベートした。免疫複合体を8℃で30-60分インキュベーションする間に蛋白質A-アガロースで集め、洗浄緩衝液(50mMトリス(pH7.5)、0.1%トリトンX-100、137mMNaCl、2mMEGTA)で3回洗浄し、5分間溶解緩衝液および(250mMトリス(pH6.8)、10%SDS、10%β-メルカプトエタノール、40%グリセロール)の混合物(80:20)中で煮沸した。分別しなかった溶解物をトリス、SDS、β-メルカプトエタノールおよびグリセロールと同じ最終濃度にし、5分間煮沸した。免疫沈降物および溶解物をSDS-PAGEに付し、続いて指定の抗体(1:1000ないし1:5000希釈を使用)で増強化学ルミネセンス検出系を用いてウエスタン・ブロット分析に付した(キャンベル, G. S.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 268巻、7427-7434頁 (1993年))。幾つかの実験では、ウエスタン・ブロットの前に蛋白質を免疫複合体から解離し、次に再び免疫沈降させた。

【0167】免疫複合体の解離および再免疫沈降
最初の免疫沈降物由来の免疫複合体を一度50mMトリス、137mMNaCl(pH7.5)で洗浄し、2倍に濃縮したストックの等量を加えることにより、0.75%SDS、2%β-メルカプトエタノール、100mMDTT、100μg/mlアプロチニンおよび100μg/mlロイペプチンの最終濃度にし、次に5分間煮沸した。

【0168】溶出した蛋白質を溶解緩衝液で10倍に希釈した。一部を取り除き、SDS-PAGE試料緩衝液と80:20で混合し、5分間煮沸した。残っている試料を第二の抗血清と共に氷上60-90分間および蛋白質A-アガロースと共に8℃で1時間インキュベートした。その免疫複合体を溶解緩衝液で3回洗浄し、洗浄緩衝液およびSDS-PAGE試料緩衝液の80:20混合液で5分間煮沸した。

【0169】キナーゼアッセーのための免疫沈降
血清を取り除いた細胞を30ng/mlhGHの存在無しで25℃で60分間インキュベートした。キナーゼアッセーの間、イン・ビトロで³²Pのpp130およびGHRへの取り込みを最大にするため、比較的長いインキュベーション周期、低GH濃度、および低温で行った。細胞をリン酸緩衝液化塩水で洗浄し、25mMHEPES、2mMNa₂CO₄、0.1%トリトンX-100、0.5mMDTT、1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、10μg/mlアプロチニン、10μg/mlロイペプチン(pH7.4)(HVT)で可溶化し、4℃で1時間200,000xgで遠心分離にかけた。可溶性蛋白質をαGH(1:10,000希釈)、αPY-シェイファー(細胞のプレート当たり15μg)またはαJak2(1:1,500希釈)のいずれかで1時間氷上でインキュベートした(カーター-Su., C.等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264巻、18654-18661頁 (1989年))。蛋白質A-アガロースを加えて更に8℃で1時間おいた。免疫複合体を50mMHEPES、150mMNaCl、0.1%トリトンX-100、0.5mMDTT(pH7.6)(NHT)で3回、次に50mMHEPES、100mMNaCl、6.25mMMnCl₃、0.1%トリトンX-100、0.5mMDTT(pH7.6)(HNMT)で1回洗浄した。

【0170】αPYおよびαJak2での連続免疫沈降
αPY蛋白質A-アガロース複合体で固定化した蛋白質を小さいプラスチックカラムに移し、5分間HNMT(溶出緩衝液)中10mMp-ニトロフェニルホスフェート、20μg/mlアプロチニン、20μg/mlロイペプチンで平衡にした。次にリン蛋白質を溶出緩衝液180μlで溶出し、αJak2(1:200希釈)を加え、混合液を1時間氷上でインキュベートした。蛋白質A-アガロースおよび20μg/mlアプロチニン、20μg/mlロイペプチンを含有するHNMT(リン酸化緩衝液)0.7mlを加え、6℃で1時間インキュベーションを続けた。免疫複合体をNHTで3回、リン酸化緩衝液で1回洗浄した。

【0171】イン・ビトロでのキナーゼアッセーおよびホスホアミノ酸分析

αJak2またはαGHで固定化した蛋白質をリン酸化緩衝液95μlと混合した。次に[γ³²P]ATPを加え、10μMATPと5mMMnCl₂の最終濃度を得た。30℃で10分後、NHT中10mMEDTAを添加して反応を止めた。免疫複合体をNHTで3回、リン酸化緩衝

液で1回洗浄した。³²P-標識蛋白質を二次免疫沈降またはSDS-PAGE試料緩衝液中で5分の煮沸のいずれかに付し、SDS-PAGEにより溶解し、オートラジオグラフィーで可視化した。リン酸化蛋白質のホスホアミノ酸含量を改良したハンターおよびセルトンの方法(ハンター, T. およびセルトン, B.M., プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・U.S.A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 1311-1315頁(1980年))を用いて前記した様に限定酸加水分解により測定した(カーター・S., C.等, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264巻, 18654-18661頁(1989年); ストレッド, S.E.等, エンドクリノロジー (Endocrinology), 127巻, 2506-2516頁(1990年); ワング, X.等, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 17390-17396頁(1992年))。

【0172】SDS-PAGEおよび濃度測定
蛋白質を前記の様に3%-10%勾配ゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=30:0.05)のSDS-PAGEにより分離した(カーター・S., C.等, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264巻, 18654-18661頁(1989年))。濃度の測定は、アップル・コンピューターに付随しているバイオメド・インストルメンツ・レーザー・スキャニング濃度計を用いて行った(バイオメド・インストルメンツ・ビデオホレス・II・データ分析コンピュータープログラム)。

【0173】**実施例4**: タンパク質チロシンキナーゼJak2による、インターフェロン- γ シグナル形質導入経路(transduction pathway)に欠失を有する突然変異細胞系の補償

要約

細胞表面マーカーCD2をインターフェロン- γ 誘導可能9-27遺伝子プロモーターの制御下に置き、ヒトHT1080細胞に導入した。CD2がインターフェロン- α 、 β および γ により応答性を示す、細胞クローンを選択し、突然変異細胞プールを、インターフェロン- γ に応答したCD2およびクラスI HLAの表面発現の欠失に関してスクリーニングした。様々な補償群における突然変異体を単離した。突然変異体 γ -1は、調べた全インターフェロン- γ 誘導可能遺伝子の誘導において欠陥を有していたが、インターフェロン- α および β に対しては正常な応答を維持していた。突然変異 γ -1をタンパク質チロシンキナーゼJak2でトランスフェクションすると、野生型表現型が回復された。インターフェロン- γ への一次応答におけるJak2の役割が示された。

【0174】序論

インターフェロン類(IFN類)は細胞に抗ウイルス状

態を付与し、細胞増殖および機能の両方に影響する [Pestka, S., et al. Annu. Rev. Biochem. 56:727-777 (1987)]。ヒトIFNには α 、 β および γ の3つの主要な抗原型がある。IFN類- α および β 、およびIFN- γ による遺伝子誘導は別々の受容体(レセプター)を介して行われる。少数のIFN- β 特異的受容体の存在は排除できず [Pellegrini, S. et al., Mol. Cell. Biol. 9: 4605-4612 (1989)]、そしてIFN- α サブタイプの多重性は、これらとIFN- α β 受容体(群)との相互作用が複雑であるらしい、ということを示している。IFN- α β のシグナル形質導入経路およびIFN- γ のシグナル形質導入経路の両方に影響する突然変異体の単離により、共通の因子が関与していることが示された [Johnson, J. et al., Mol. Cell. Biol. 11: 4189-4195 (1991); McKendry, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11455-11459 (1991)]。そのような因子の1つ(後述、および実施例4)が、最近同定された [Schindler, C. et al., Science 258: 1808-1812 (1992); Shuai, K. et al., Science 258: 1808-1812 (1992)]。主要な受容体両方のIFN-結合成分がクローンされた [Aguet, M. et al., Cell 55:273-280 (1988); Uze, G. et al., Cell 60:225-234 (1990)]。シグナル形質導入サブユニットはまだ単離されねばならないが、IFN- α およびIFN- β に応答して活性化された1次転写因子ISGF3の、p48、p84、p91およびp113ポリペプチド成分は既にクローンされ、特性化されている [Veals, S.A. et al., Mol. Cell. Biol. 12: 3315-3324 (1992); Schindler, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7836-7839 (1992); Schindler, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7840-7843 (1992)]。p91、p84およびp113のチロシンはIFN- α に反応して、p91およびp84のチロシンはIFN- γ に反応して迅速にリン酸化される [Shuai, K. et al., Science 258: 1808-1812 (1992)]。さらに、IFN- α β 応答性の6-16遺伝子プロモーターの有力な制御下にある薬物選択性マーカーを発現している細胞から単離された突然変異体UIA(11.1)の補償が、IFN- α β 応答経路におけるタンパク質チロシンキナーゼTyk2に関与していることが明らかになった [Velazquez, L. et al., Cell 70:313-322 (1992)]。本実施例では、他の選択法を用い、タンパク質チロシンキナーゼの同じファミリーの他のメンバー、Jak2 [Wilks, A.F., et al., Mol. Cell. Biol. 11:2057-2065 (1991); Harpur, A.G. et al., Oncogene 7:1347-1353 (1992); Firmbach-Kraft, I. et al., Oncogene 5:1329-1336 (1990); 実施例1]によってIFN- γ 応答における突然変異が補償されることを報告する。

【0175】結論

9-27遺伝子プロモーターは、IFN- α およびIFN- β と同様、IFN- γ によっても誘導され得る [Reid, L.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:840-84

4 (1989)〕。このプロモーターからの意義ある構成的な発現により、薬物選択プロトコルが不要となった。したがって、9-27プロモーターの制御下で単一の細胞表面マーカー (CD2) (通常、T細胞表面でのみ発現) を発現する細胞クローン (2C4) を誘導し、蛍光活性化細胞ソーター (FACS) を用いて、IFN- γ 誘導性の欠失または獲得をスクリーンした。内因性クラスIおよびクラスII HLA類のIFN-誘導可能発現も監視した。2C4細胞内では、全ての3種の抗原のIFN- γ による、そしてCD2およびクラスIのIFN- α による、誘導が観察された。

【0176】2C4の突然変異誘発および数ラウンドのソーティングによって突然変異体 $\gamma-1$ を単離した。シス突然変異体よりむしろトランス突然変異体の単離を進めるために、そして2次IFN- γ 応答経路よりむしろ一次IFN- γ 応答経路における突然変異体を単離するために、最後の2回のソーティングはCD2およびクラスIの両方について行った。突然変異体 $\gamma-1$ はIFN- γ への応答を欠くが、IFN- α およびIFN- β にはそうでない。しかしながら、この突然変異体のネズミ Jak2 発現構築物 (実施例1) によるトランスフェクションでは、豊富化されたトランスフェクタント集団およびクローン内で、3つの細胞表面マーカー全部のIFN- γ 応答が回復された。同じ構築物で、ネズミ Jak1 によるトランスフェクションでは、効果がなかった。IFN- γ 誘導可能なmRNAのスペクトルの発現をRNase保護により監視した。試験した8種のIFN-誘導可能なmRNA類の全部について、陽性IFN- α 応答 (IRF1およびGBPに関し最少) は2C4、突然変異体 $\gamma-1$ および $\gamma-1$ /Jak2トランスフェクタントに関して同じであった。しかし、IFN- γ に関しては、2C4で観察される応答が $\gamma-1$ で欠失しているが、 $\gamma-1$ /Jak2トランスフェクタントでは回復されていた。最近、ガンマ活性化配列 (GAS) モチーフが、GBPおよびITF1遺伝子のp91を介した一次IFN- γ 応答を仲介すると同定された [実施例1参照; Decker T. et al., EMBO J.10:927-932 (1991); Kanno, Y. et al., Mol. Cell. Biol. 13:3951-3963 (1993)]。試験した残りの遺伝子の一次IFN- γ 応答を支配しているDNA要素および/または因子は、今後正確に確立されねばならない。しかしながら、試験した遺伝子全部が影響を受けたという事実は、突然変異体 $\gamma-1$ における欠失が一次IFN- γ 応答経路内にあるということと一致する。

【0177】すべての例でIFN- γ 応答がJak2により回復され、野生型2C4および $\gamma-1$ /Jak2トランスフェクタントに関するIFN- γ 用量応答曲線は基本的に同一であった: 10IU/mlで明確な応答が見られ、100IU/mlで最大応答への接近が見られた。機能的なTyk2発現クローンによる $\gamma-1$ 細胞の

トランスフェクションでは、IFN- γ 応答の回復が観察されず、逆の実験では、U1突然変異体内でのTyk2における欠失のJak2による補償がなかった。Jak1およびTyk2の場合のように、ウエスタントランスファーで野生型に匹敵するレベルが観察されたので、突然変異体 $\gamma-1$ 細胞における欠失はJak2タンパク質の不在を反映するものではない。Jak2の免疫沈降およびウエスタントランスファーのためのプローブに用いた抗ペプチド抗体はJak1とJak2とを区別しJak2に高い特異性を有するように設計されている (実施例1-2参照)。 $\gamma-1$ 内の突然変異は、したがって、Jak2の機能に影響するが、その生産には影響しない、点または小さい突然変異を反映しているであろう。あるいは、突然変異は、突然変異してしますと、正常な濃度の内因性ヒトJak2とは生産的に反応しないが、トランスフェクトネズミにおける高濃度 (実施例2参照) Jak2によって救われる、上流成分におけるものかもしれない。関連する突然変異の正確な性質を確信するには、さらに実質的な研究を行う必要がある。しかしながら、突然変異体 $\gamma-1$ における欠失は、IFN- γ とその受容体との結合に明白で重要な影響を及ぼしていない。野生型2C4と突然変異体 $\gamma-1$ 細胞に、実質上同じ結合が再現性をもって観察された。これは、Tyk2における欠失によってIFN- α の高親和性の受容体結合が喪失される [Pellegrini, S. et al., Mol. Cell. Biol. 9:4605-4612 (1989)] という突然変異体U1A (元々、記号11.1で表された) の場合と対照的である。この相違が、 $\gamma-1$ 内のJak2の不在でなく、U1A内のTyk2の不在を反映するものか、あるいは2種類のキナーゼと、それらのそれぞれの受容体複合体との推定の相互作用における、より基本的な相違を反映しているかを決定することは興味深い。Jak2タンパク質はTyk2と同様、野生型細胞内では、IFN- γ または α に応答して有意に誘導されることはないようである。

考察

本実施例では、試験した遺伝子すべてがIFN- γ 応答を欠いている、突然変異ヒト細胞系が、ネズミJak2によって補償されることを示した。以下の点が実施例5で明らかにされる。(1)突然変異体 $\gamma-1$ における欠失は一次応答経路の早期におけるものであることの、直接的な証明、(2)IFN- γ に反応してJak2のチロシンが迅速にリン酸化される、(3)結果は突然変異細胞ではなく野生型細胞で、IFN- γ に反応してJak2が迅速に活性化および(自己)リン酸化するということが一致している。 $\gamma-1$ における突然変異の正確な性質とは無関係に、これらのデータは一次IFN- γ 応答におけるJak2の基本的な役割を示している。Jak2に対する抗体の入手可能性、およびIFN- γ 応答経路における付加的な補償群の突然変異体の入手可能性

は、この応答に関与する成分の数および性質の決定にとって、計り知れない程、貴重なことであることが分かるに違いない。

【0178】方法および原料

野生型2C4細胞；突然変異体 $\gamma-1$ 細胞；およびネズミJak2cDNA発現構築物によって安定にトランスフェクトされた突然変異体 $\gamma-1$ 細胞；における、IFN- α または γ に応答した、トランスフェクトされたCD2および内因性クラスIおよびクラスII HLA類の細胞表面発現

データはFACSCAN (Becton Dickinson)分析(300データポイント、Consort 30)を用いて、豊富化集団および $\gamma-1$ /Jak2トランスフェクタントのクローンに関して一般化した。細胞を 5×10^5 /10cmプレート皿でプレートし、翌日 10^3 IU/mlの $\alpha-1$ IFN高純度混合物(Wellferon 1.5×10^8 IU/mgタンパク質、Wellcome Research Laboratories, Beckenham, UKから提供)または組換えヒトIFN- γ (4×10^7 IU/mgタンパク質、Dr. Gunter Adorf, Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Vienna, Austriaから提供)で処理した。細胞(10^6)を、ヒトCD2 (Dako-CD2 MT910, DAKO A/S Denmark)またはHLA DRA (クローンL243, Becton Dickinson)に対する、R-フィコエリスリン-結合ネズミモノクローナル抗体、またはヒトHLA ABC (W6/32, Seralab, UK)に対するFITC-結合ネズミモノクローナル抗体を用いて、0℃で30分間染め(stain)、1%パラホルムアルデヒドで固定化した。クローン2C4は、ヒトHT1080細胞のpDW9-27CD2およびpTKNcoによるコトランスフェクション(同時トランスフェクション)およびG418耐性クローンのFACSCAN分析によって導いた。pDW9-27CD2はPJ3omega (Morgaenstern, J.P. et al., Nucl. Acids Res. 18:1068 (1990))のSV40プロモーターが9-27遺伝子 [Reid, L.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:840-844 (1989)]の1.8 kb HindIII-BspMIIプロモーター断片で置換されたPJ3omegaの改良型であって、ポリリンカーのEcoRI部位に完全長さのCD2cDNA [Sewell, W.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8718-8722 (1986)]を有する。ICR191による突然変異誘発(5ラウンド)は既に報告されている(McKendry, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11455-11459 (1991))。IFN- γ に応答しない細胞は、FACSTAR Plus セルソーター(Becton Dickinson)を用いて「選別」した。 5×10^7 の突然変異細胞を48時間、組換えヒトIFN- γ の500 IU/mlで処理し、再度懸濁し、CD2に対する、フィコエリスリン-結合抗体および(最後の2ソート(sort)に関しては)HLAクラスI (前記)に対する、FITC-結合抗体を用いて染め、すぐにソーティングを行った。蛍光を発

している細胞の底から2%を収集した。6回のソーティングの後、豊富化集団の制限希釈法により、クローン $\gamma-1$ を単離した。それは新規なIFN- γ , α , β 表現型を表し、既述の他のIFN- γ 突然変異体 [Loh, L.E. et al. EMBO J. 11:1351-1363 (1992); Mao, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2880-2884 (1993)]とは別であった。この表現型は少なくとも3カ月の連続培養で安定であった。

【0179】突然変異体 $\gamma-1$ は、pRK5内のCMVプロモーターから下流の完全長さの、ネズミJak2cDNAを用い、ピューロマイシン選択可能マーカープラスミドの存在下でトランスフェクトすることによって補償された。安定なトランスフェクタントのピューロマイシン耐性集団を組換えIFN- γ で処理し、FACSソートし、応答細胞の上部7%を回収し分析した。豊富化集団から制限希釈法で得た $\gamma-1$ /Jak2トランスフェクト細胞のクローンについても分析し、該IFN- γ 応答の完全な回復を観察した。

野生型2C4、突然変異体 $\gamma-1$ およびJak2でトランスフェクトされた $\gamma-1$ 突然変異体細胞におけるIFNで誘導可能な遺伝子の発現: 9-27, 6-16, 2-5 A合成酵素遺伝子およびISGF3 γ 遺伝子およびp91/84 ISGF3 α 遺伝子のp91およびp84交互スプライシング産物、およびIRF1遺伝子およびGBP遺伝子の、IFN-誘導可能mRNA類を検出するためのプローブを用い、RNaseプロテクション(保護)によって、IFN- α または γ に応答したmRNA発現を監視した。 γ -アクチンmRNAの保護を内部に負荷されたコントロールとして用いた。単一細胞層から、NP40溶解およびフェノール/クロロホルム抽出によって、細胞質RNAを調製した [Porter, A.C.G., et al., EMBO J. 7:85-92 (1988)]。RNase保護は、インプットDNA [Melton, D.A. et al., Nucl. Acids Res. 12:7035-7156 (1984)]の2-5 $\times 10^8$ cpm/ μ gに対する 32 P UTP標識RNAプローブ類で行った。1-3 $\times 10^5$ cpmの各プローブおよびRNA 10 μ gを各検定に用いた。

【0180】野生型2C4細胞、突然変異体 $\gamma-1$ 細胞およびネズミJak2でトランスフェクトされた突然変異体 $\gamma-1$ 細胞($\gamma-1$ Jak2 tr)におけるJak2の発現: Jak2に対する抗血清(実施例1)およびプロテインAセファロース [Pharmacia; John J., et al., Mol. Cell. Biol. 11:4189-4195 (1991)]でプレクリ-した全細胞(10^7 細胞)抽出物からJak2タンパク質を免疫沈降させ、Jak2に対する抗体とECL検出装置 (Amersham International, UK)を用い、SDS-PAGEおよびウェスタントランスファーで分析した。突然変異体 $\gamma-1$ 細胞抽出物のために、抗血清(Jak2 pept)を惹起したJak2ペプチドの不在(no pept)または存在(30 μ g/ml)下で、あるいは非特

異的対照として、無関係なJak1ペプチド(Jak1)を用いて、免疫沈降を行った。

【0181】2C4細胞および突然変異体 $\gamma-1$ 細胞への ^{125}I -標識IFN- γ の結合: 3回、 10^6 細胞試料を用い、 0°C で90分間、 ^{125}I -IFN- γ (667 Ci/mM, Amersham International, UK) 処理を行った。非特異的な結合を差し引いた。200倍過剰の非標識IFN- γ の存在下で並行して測定したところ、全放射活性の約40%が結合した。並行して行ったEMCウイルスに対する抗ウイルス検定により、1fmoleの ^{125}I -IFN- γ が0.15IUに相当した。最高のIFN- γ 濃度での特異的結合は、約6000受容体/細胞に相当した。IFNを低い比活性に希釈すると、約10,000受容体/細胞で飽和結合が認められた。

【0182】**実施例5:** インターフェロン- γ にตอบสนองしたタンパク質チロシンキナーゼJak2の活性化要約

突然変異体 $\gamma-1$ 細胞は、インターフェロン- α および β には正常にตอบสนองするが、試験した全遺伝子に関し、インターフェロン- γ へのตอบสนองが欠失している。この突然変異体は、タンパク質チロシンキナーゼJak2によって補償される(実施例4)。野生型細胞では、一次インターフェロン- γ シグナル形質導入経路に中心的な役割を果たす転写因子p91が、インターフェロン- γ にตอบสนองしてチロシン部位で迅速にリン酸化される。突然変異体 $\gamma-1$ 細胞ではそのようなリン酸化は起こらないが、Jak2で $\gamma-1$ 細胞を補償すると、それが回復される。さらに、野生型細胞では、インターフェロン- γ にตอบสนองして、Jak2自身のチロシンも迅速にリン酸化される。ヒトおよびマウス細胞からの免疫沈降のインビトロキナーゼ検定において、インターフェロン- γ 依存性リン酸化も観察される。そのようなリン酸化は突然変異体 $\gamma-1$ 細胞では見られず、あるいはインターフェロン- α にตอบสนองしては見られない。これらの結果は一次インターフェロン- γ シグナル形質導入経路におけるJak2早期の役割を示唆している。

【0183】結果

インターフェロン類、 α 、 β および γ は別々の受容体を通して、オーバーラップする遺伝子セットを誘導する

[Pestka, S., et al. Ann.Rev.Biochem.56:727-777 (1987)]。近年、関連のシグナル形質導入経路に関する知識が急速に進展した。この中心は、複雑なIFN- $\alpha\beta$ 誘導可能な転写因子であるISGF3のp91成分がIFN- $\alpha\beta$ 応答経路およびIFN- γ 応答経路に2重の役割を果たしているということが分かった点にある。p91はいずれかの型のIFNにตอบสนองして迅速にチロシン部位でリン酸化される[Schindler, C. et al., Science 257: 809-813 (1992); Shuai, K. et al., Science 258: 1808-1812 (1992)]。これに一致して、p91は広範な遺伝子スペクトルのIFN- γ 応答に必要とされる。そ

れは、最初GBP遺伝子の転写活性化に必要であるとして同定されたガンマ活性化因子(GAF) [Decker et al., EMBO J. 10:927-932 (1991)] に相当すると思われる、それ以後、共通のDNAモチーフを介した、多くの付加的遺伝子のIFN- γ にตอบสนองした活性化における関与が暗示されている[Shuai et al. Science 258:1808-1812 (1992); Pearse et al. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 90:4314-4318(1993); Kanno et al., Mol.Cell.Biol. 13:3951 (1993)]。従って、突然変異体 $\gamma-1$ をp91のリン酸化に関して分析した。 ^{32}P iの取り込みによって検定したp91のリン酸化は、野生型2C4細胞で迅速に起きた。突然変異体 $\gamma-1$ ではそのようなリン酸化は見られなかった。 ^{32}P iの取り込みにより、あるいはホスホチロシンに対する抗体で監視すると、Jak2で補償された $\gamma-1$ 細胞内で、p91のリン酸化が起こった。正常なレベルのp91が存在し、興味深いことには、ISGF3 α のp91およびp113成分のIFN- α によるリン酸化は突然変異体細胞内で正常であった[IFN- α または γ にตอบสนองしたISGF3 α のp84成分のリン酸化は常に低く、しばしば検出困難である; Schindler et al., Science 258: 1808-1812(1992); Shuai, et al., Science 258: 1808-1812 (1992)]。

【0184】さらに、 $\gamma-1$ 細胞は機能的なp91発現構築物では補償されない。 $\gamma-1$ 細胞における欠失は、従って、p91の上流である。Jak2のチロシンリン酸化を特異抗体による免疫沈降、次いでホスホチロシンに対する抗体を用いる免疫沈降物のウェスタンブロッティング分析によって監視した。これによると、突然変異体 $\gamma-1$ 細胞ではなく野生型細胞内で、IFN- γ にตอบสนองしてJak2のチロシンが迅速にリン酸化される。IFN- α によるTyk2のリン酸化が容易に観察される条件と同一の条件下では、IFN- α にตอบสนองしたJak2のそのようなリン酸化は観察されなかった。

【0185】Py-20および4G10抗ホスホチロシン抗体の混合物を用い、IFN活性およびホスホチロシンの検出の両目的のために、IFN- γ にตอบสนองしたp91のチロシンリン酸化、および内部コントロールとして、IFN- α にตอบสนองしたp91およびp113のリン酸化を、並行して監視した。同じトランスファーをJak2に対する抗体で再ブローブすると、野生型および $\gamma-1$ 突然変異細胞内で匹敵するレベルのJak2タンパク質が検出された。従って、 $\gamma-1$ における欠失はJak2の生産よりも、むしろリン酸化/機能に関連する(実施例4参照)。Jak2の明らかなりん酸化は免疫学的に交差結合するタンパク質のそれであり得る。しかしながら、用いた抗血清はJak1には保存されていないJak2ペプチドに対して惹起されたものであり、Jak2に対して高い特異性を有する(実施例1および2参照)。これと一致して、適当な競合ペプチドの存在

下、免疫沈降したとき、りん酸化されたタンパク質は、回収されなかった。 γ -1/Jak2トランスフェクタントには、IFN- γ 処理がないときでも、過剰発現された外因性ネズミJak2の高い「バックグラウンド」レベルのチロシンりん酸化が存在した。この根拠は分かっていない。このバックグラウンドに抗して、Jak2の全チロシンりん酸化が、補償された細胞内でIFN- γ に反応して見られる。しかし、興味深いことには、検定時に、 γ -1/Jak2トランスフェクタント内に、Jak2りん酸化の明らかな増大が観察されない実験においても、一貫して、並行したインビトロキナーゼ検定（下記参照）ではIFN- γ に対する実質的な応答が観察された。従って、トランスフェクトされたJak2は、IFN- γ に反応してりん酸化され得る。野生型細胞においてIFN- γ に反応して観察されたりん酸化はJak2に起因すると結論することは理に適っている。

【0186】成長因子に反応したタンパク質チロシンキナーゼの活性化は、古典的には、活性化酵素の免疫沈降におけるキナーゼ活性として検出される。IL3（実施例1）およびエリスロポイエチン（実施例2）に反応して活性化されたJak2はインビトロキナーゼ活性で同様の観察結果を与える。これは、IFN- γ に反応したJak2の場合もそうである。IFN- γ 依存性キナーゼ活性は野生型2C4細胞または突然変異 γ -1/Jak2トランスフェクト細胞からのJak2免疫沈降物の検定でも観察される。そのような活性はIFN- α に対する応答では観察されず、また免疫沈降を突然変異 γ -1細胞から、あるいは競合的Jak2ペプチドの存在下で野生型細胞から、行ったときに観察されない。Jak2のりん酸化はヒトHT1080誘導細胞のみに限定されず、他のヒト細胞系およびマウスL-細胞を含めて様々なマウス細胞系でIFN- γ （IFN- α でなく）に反応して見られる。

【0187】考察

本実施例の結果および実施例4の結果はJak2がIFN- γ に反応して活性化され、そのような活性化が一次IFN- γ 応答経路の早期に役割を果していることを示している。IFN- α およびIFN- γ に反応してp91が同じ部位（Ty r 701）でりん酸化されること [Schindler, C. et al., Science 257: 809-813 (1992); Shuai, K. et al., Science 258 :1808-1812 (1992)] を認めた上で、これとの関連において、 γ -1突然変異におけるIFN- α に反応したp91の正常なりん酸化が興味深い。Ty k 2またはJak2の各々が同じチロシンのりん酸化を行い得るか、より興味深いことは、これに関与する他のキナーゼ（類）があるかどうかということについて結論を得ることができる。Jak2の活性化については、エリスロポイエチンの場合、Jak2とエリスロポイエチン受容体との直接相互作用を介して起きるようである（実施例2）。IFN- γ 経路の

場合に、同様の相互作用があるか否かに明らかにかなり興味がある。エリスロポイエチン、IL3および他の多くのサイトカイン類で共通のJak2活性があること（実施例1-3）から、明白な質問が提起される。将来、最も推進すべき主な仕事は、Jak2と相互反応するタンパク質の性質の同定および応答の特異性を決定する因子の同定である。

【0188】原料および方法

正常な細胞および突然変異した γ -1細胞におけるIFN- γ に反応するp91のチロシンりん酸化：野生型（2C4）、突然変異 γ -1およびJak2でトランスフェクトした突然変異 γ -1（ γ -Jak2tr）における、IFN- γ に反応したp91のりん酸化を³²P94iの取り込みあるいはホスホチロシンに対する抗体によるウエスタントランスファーで監視（モニター）した。IFN- α に反応したISGF3のp91およびp113成分のチロシンりん酸化の場合のように、10³ IU/mlで15-0分間、ウエスタントランスファーでp91タンパク質濃度を監視した。プレクリアーした全細胞（10⁷細胞）抽出物から、p91に対する抗血清とプロテインAセファロース（Pharmacia）を用いて、既述のごとく [Schindler, C. et al., Science 257: 809-813 (1992); Shuai, K. et al., Science 258 :1808-1812 (1992)]、p91を免疫沈降させ、PY20（ICN）および4G10（UBI）抗ホスホチロシン抗体混合物を用い、さらに0.1M Tris-HCl(pH 8.0)内に剥ぎ取った後、p91に対する抗体を用いて、SDS-PAGEおよびウエスタントランスファーで分析した。p91及びp113（IFN- α 活性化ISGF3 α 内で複合体形成）をp113に対する抗体で共免疫沈澱し [Schindler, C. et al., Science 257: 809-813 (1992)]、上記のごとく抗ホスホチロシン抗体を用いてSDS-PAGEおよびウエスタントランスファーで分析した。ウエスタントランスファーにおける検出は、ジアミノベンジジン（Amersham, UK）で染色したp91抗体でトランスファーをスクリーンする以外はECL（Amersham, UK）で行った。

野生型2C4細胞、突然変異 γ -1細胞および突然変異 γ -1/Jak2トランスフェクト細胞におけるIFN- γ （IFN- α でなく）に反応したJak2のチロシンりん酸化：Jak2、および対照としてのp91およびp113のりん酸化を、免疫沈澱、SDS-PAGEおよび、PY20（ICN）および4G10抗ホスホチロシン抗体混合物を用いて、ECL（Amersham International, UK）によるウエスタントランスファーでホスホチロシンに関し分析した。IFN- γ 処理細胞からの抽出物をJak2およびp113に対する抗体の混合物を用いて免疫沈降させた（後者はIFN- α 活性化ISGF3から091と共沈澱した）。同じプロットを剥ぎとり（既述のごとく）、Jak2に対する抗体で再ブロー

ブした。IFN- γ で15分間処理した細胞からの抽出物を、指摘のごとく、0.1mgの、それに対してJak 2に対する抗血清が惹起された(実施例1) Jak 2ペプチドの存在または不在下で、Jak 2に対する抗体を用い、または無関係なJak 1ペプチドを用いて、免疫沈降した。免疫沈降物を上記のようにホスホチロシンに対する抗体を用い、SDS-PAGEおよびウエスタン・トランスファーで分析した。細胞の増殖および 10^3 IU/mlの高純度IFN- γ または α による処理は上記と同様である。

【0189】インビトロでのキナーゼ活性：IFN依存性Jak 2リン酸化を(A)野生型(2C4)および突然変異 γ -1/Jak 2トランスフェクト細胞、(B)野生型(2C4)および突然変異 γ -1細胞および

(C)マウスL-細胞からの免疫沈降で分析した。指摘したIFN- γ または α (500 IU/ml)処理を15分間行った。プロテインAセファロース(Pharmacia)上の免疫沈降物を50mM NaCl、5mM MgCl₂、5mM MnCl₂、0.1mM Na₃VO₄、10mM HEPES pH 7.4で洗浄し、0.25mCi/mlの³²P- γ -ATPを含有する同じバッファー中で室温で30分間インキュベートした(実施例1-2参照)。十分な洗浄で試料バッファー中にタンパク質を溶出させた後、SDS-PAGEで分析した。検出はオートラジオグラフィーまたは上記のようにホスホチロシンのウエスタン・トランスファーで行った。ヒト細胞の増殖およびIFN処理は上記と同様である。マウスL-細胞の増殖およびIFN処理も上記と同様であるが、組換えネズミIFN- γ ($1-2 \times 10^7$ IU/mgタンパク質、Dr. Gunter Adolf, Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Vienna, Austriaから提供)または組換えヒトIFN- α /D (Bg1)(マウス細胞に高度に反応性(2×10^5 IU/mgタンパク質)；Dr. Sidney Pestka, Robert Wood Johnson Medical School, NJ, USAから提供)を用いた。

【0190】実施例6：Jak 2キナーゼ活性を阻害するEpo活性(ゲネスタイン：Genestein)インヒビター(阻害物質)

Jak 2の生化学活性はインビトロキナーゼ検定を用いて証明されるだろう。この検定では、プロテインAセファロースに結合したJak 2特異的抗血清を用い、細胞リゼートから精製Jak 2を沈殿させる。次いで免疫沈降したJak 2をキナーゼバッファー(50mM NaCl、5mM MgCl₂、5mM MnCl₂、0.1mM Na₃VO₄、10mM HEPES pH 7.4)で洗浄した後、0.25mCi/mlの³²P- γ -ATPを含有する同容量のキナーゼバッファー内で室温で30分間インキュベートする。十分な洗浄の後、タンパク質をSDS-PAGEのために試料バッファーで溶出し、7%ゲル上で分析する。次いで、オートラジオグラフィーにより³²

P-含有タンパク質を観察する。この検定システムを用い、活性Jak 2キナーゼが、例えばエリスロポイエチン(Epo)またはインターロイキン-3(IL-3)のような適当なサイトカインで処理された哺乳類細胞にのみ存在することが証明された。即ち、Jak 2触媒活性の活性化はこれらサイトカイン類の生化学的活性に関連していた。この関係はさらにゲネスタインとして知られているチロシンキナーゼ特異的阻害物質を用いる研究でも支持される。ゲネスタインはEpoの細胞増殖刺激作用を阻害することが知られている。上記のインビトロキナーゼ検定に、0.1mMのゲネスタインを含ませることで、Jak 2のチロシンキナーゼ活性が1/2に減少された。即ち、ゲネスタインのEpo誘導細胞増殖に対する阻害効果は、そのJak 2阻害作用によると説明できる。

【0191】実施例7：昆虫細胞での構成的に活性なJak 2キナーゼの生産

Jak 2の活性形は適当なサイトカインで刺激された哺乳類細胞にみから単離されるので、本発明者らは、触媒的に活性なJak 2の、サイトカイン刺激を要しない発現系を開発した。詳しくは、昆虫細胞で高レベルに発現されたJak 2は構成的に活性状態にある。この発現は、Jak 2 cDNAをバキュロウイルストランスファーベクターpVL1392(PharMingen, San Diego CA)のNot IおよびSma I部位の間に挿入することにより、達成された。次いでこのJak 2/ベクター構築物を、欠失バキュロウイルスDNA(BaculoGold DNA, PharMingen, San Diego, CA)と一緒に昆虫細胞に同時トランスフェクトした。欠失バキュロウイルスDNAおよびJak 2/ベクターDNAの間の組換え現象によって、構成的にJak 2を発現する、生存可能なバキュロウイルスをコードするDNAが得られる。昆虫細胞にこの組換えバキュロウイルスを感染させると活性なJak 2が高レベルに発現され、それをJak 2特異的抗血清を用いて免疫沈殿させる。この活性Jak 2源はこの酵素の生化学的特性の研究に有用であり、本明細書に記載のインビトロJak 2キナーゼ検定に基き、Jak 2キナーゼ活性の阻害物質を検定する上でも有用であろう。本発明をその具体的な実施態様に関して記述したが、本出願は発明の一般的原則に従った、発明のあらゆるバリエーション、用途または応用をカバーすること、および、本発明が属する技術分野での既知または通常のプラクティスの範囲内での本開示からの変更であって、本明細書に記載の基本的な特徴に適用され、本願の特許請求の範囲に従うものを、包含することを意図するものである。

【0192】

【配列表】

【0193】配列番号1：

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Trp Ser Xaa Trp Ser

1

5

配列

Val Leu Pro Gln Asp Lys Glu Tyr Tyr Lys Val Lys Glu Pro Gly

1

5

【0194】配列番号2:

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

10 15

【0195】配列番号3:

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Ala Ile Glu Thr Asp Lys Glu Tyr Tyr Thr Val Lys Asp Asp Arg

1

5

10 15

【0196】配列番号4:

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Ala Val Pro Glu Gly His Glu Tyr Tyr Arg Val Arg Glu Asp Gly

1

5

10

15

【0197】配列番号5:

配列の長さ: 19

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Asp Ser Gln Arg Lys Leu Gln Phe Tyr Glu Asp Lys His Gln Leu Pro

1

5

10

15

Ala Pro Lys

【0198】配列番号6:

配列の長さ: 19

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Thr Leu Ile Glu Lys Glu Arg Phe Tyr Glu Ser Arg Cys Arg Pro Val

1

5

10

15

Thr Pro Ser

【0199】配列番号7:

配列の長さ: 19

30 配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Ser Pro Ser Glu Lys Glu His Phe Tyr Gln Arg Gln His Arg Leu Pro

1

5

10

15

Glu Pro Ser

【0200】配列番号8:

配列の長さ: 3629

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 94..3480

配列

CGGGGGAACA AGATGTGAAC TGTTCCTCCCT CCC

CAGAAGA AGAGGCCCTT TTTTCCTC 60

CCGCGAAGGC CAATGTTCTG AAAAAAGCTC TAG

ATG GGA ATG GCC TGC CTT ACA 114

Met Gly Met Ala Cys Leu Thr

1

5

ATG ACA GAA ATG GAG GCA ACC TCC ACA

TCT CCT GTA CAT CAG AAT GGT 162

Met Thr Glu Met Glu Ala Thr Ser Thr

Ser Pro Val His Gln Asn Gly

81							82		
10							15		
20									
GAT	ATT	CCT	GGA	AGT	GCT	AAT	TCT	GTG	
AAG	CAG	ATA	GAG	CCA	GTC	CTT		210	
Asp	Ile	Pro	Gly	Ser	Ala	Asn	Ser	Val	
Lys	Gln	Ile	Glu	Pro	Val	Leu			
25							30		
35									
CAA	GTG	TAT	CTG	TAC	CAT	TCT	CTT	GGG	
CAA	GCT	GAA	GGA	GAG	TAT	CTG		258	
Gln	Val	Tyr	Leu	Tyr	His	Ser	Leu	Gly	
Gln	Ala	Glu	Gly	Glu	Tyr	Leu			
40							45		
50							55		
AAG	TTT	CCA	AGT	GGA	GAG	TAT	GTT	GCA	
GAA	GAA	ATT	TGT	GTG	GCT	GCT		306	
Lys	Phe	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr	Val	Ala	
Glu	Glu	Ile	Cys	Val	Ala	Ala			
60							65		
70									
TCT	AAA	GCT	TGT	GGT	ATT	ACG	CCT	GTG	
TAT	CAT	AAT	ATG	TTT	GCG	TTA		354	
Ser	Lys	Ala	Cys	Gly	Ile	Thr	Pro	Val	
Tyr	His	Asn	Met	Phe	Ala	Leu			
75							80		
85									
ATG	AGT	GAA	ACC	GAA	AGG	ATC	TGG	TAC	
CCA	CCC	AAT	CAT	GTC	TTC	CAC		402	
Met	Ser	Glu	Thr	Glu	Arg	Ile	Trp	Tyr	
Pro	Pro	Asn	His	Val	Phe	His			
90							95		
100									
ATA	GAC	GAG	TCA	ACC	AGG	CAT	GAC	ATA	
CTC	TAC	AGG	ATA	AGG	TTC	TAC		450	
Ile	Asp	Glu	Ser	Thr	Arg	His	Asp	Ile	
Leu	Tyr	Arg	Ile	Arg	Phe	Tyr			
105							110		
115									
TTC	CCT	CAT	TGG	TAC	TGT	AGT	GGC	AGC	
AGC	AGA	ACC	TAC	AGA	TAC	GGA		498	
Phe	Pro	His	Trp	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	
Ser	Arg	Thr	Tyr	Arg	Tyr	Gly			
120							125		
130							135		
GTG	TCC	CGT	GGG	GCT	GAA	GCT	CCT	CTG	
CTT	GAT	GAC	TTT	GTC	ATG	TCT		546	
Val	Ser	Arg	Gly	Ala	Glu	Ala	Pro	Leu	
Leu	Asp	Asp	Phe	Val	Met	Ser			
140							145		
150									

83

84

TAC	CTT	TTT	GCT	CAG	TGG	CGG	CAT	GAT	
TTT	GTT	CAC	GGA	TGG	ATA	AAA			594
Tyr	Leu	Phe	Ala	Gln	Trp	Arg	His	Asp	
Phe	Val	His	Gly	Trp	Ile	Lys			
			155						160
				165					
GTA	CCT	GTG	ACT	CAT	GAA	ACT	CAG	GAA	
GAG	TGT	CTT	GGG	ATG	GCG	GTG			642
Val	Pro	Val	Thr	His	Glu	Thr	Gln	Glu	
Glu	Cys	Leu	Gly	Met	Ala	Val			
		170						175	
			180						
TTA	GAC	ATG	ATG	AGA	ATA	GCT	AAG	GAG	
AAA	GAC	CAG	ACT	CCA	CTG	GCT			690
Leu	Asp	Met	Met	Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	
Lys	Asp	Gln	Thr	Pro	Leu	Ala			
	185					190			
		195							
GTC	TAT	AAC	TCT	GTC	AGC	TAC	AAG	ACA	
TTC	TTA	CCA	AAG	TGC	GTT	CGA			738
Val	Tyr	Asn	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Thr	
Phe	Leu	Pro	Lys	Cys	Val	Arg			
200					205				
	210					215			
GCG	AAG	ATC	CAA	GAC	TAT	CAC	ATT	TTA	
ACC	CGG	AAG	CGA	ATC	AGG	TAC			786
Ala	Lys	Ile	Gln	Asp	Tyr	His	Ile	Leu	
Thr	Arg	Lys	Arg	Ile	Arg	Tyr			
			220						
225				230					
AGA	TTT	CGC	AGA	TTC	ATT	CAG	CAA	TTC	
AGT	CAA	TGT	AAA	GCC	ACT	GCC			834
Arg	Phe	Arg	Arg	Phe	Ile	Gln	Gln	Phe	
Ser	Gln	Cys	Lys	Ala	Thr	Ala			
			235					240	
			245						
AGG	AAC	CTA	AAA	CTT	AAG	TAT	CTT	ATA	
AAC	CTG	GAA	ACC	CTG	CAG	TCT			882
Arg	Asn	Leu	Lys	Leu	Lys	Tyr	Leu	Ile	
Asn	Leu	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser			
		250					255		
		260							
GCC	TTC	TAC	ACA	GAA	CAG	TTT	GAA	GTA	
AAA	GAA	TCT	GCA	AGA	GGT	CCT			930
Ala	Phe	Tyr	Thr	Glu	Gln	Phe	Glu	Val	
Lys	Glu	Ser	Ala	Arg	Gly	Pro			
	265					270			
		275							
TCA	GGT	GAG	GAG	ATT	TTT	GCA	ACC	ATT	
ATA	ATA	ACT	GGA	AAC	GGT	GGA			978

85					86				
Ser	Gly	Glu	Glu	Ile	Phe	Ala	Thr	Ile	
Ile	Ile	Thr	Gly	Asn	Gly	Gly			
280					285				
	290					295			
ATT	CAG	TGG	TCA	AGA	GGG	AAA	CAT	AAG	
GAA	AGT	GAG	ACA	CTG	ACA	GAA		1026	
Ile	Gln	Trp	Ser	Arg	Gly	Lys	His	Lys	
Glu	Ser	Glu	Thr	Leu	Thr	Glu			
				300					
305					310				
CAG	GAC	GTA	CAG	TTA	TAT	TGT	GAT	TTC	
CCT	GAT	ATT	ATT	GAT	GTC	AGT		1074	
Gln	Asp	Val	Gln	Leu	Tyr	Cys	Asp	Phe	
Pro	Asp	Ile	Ile	Asp	Val	Ser			
			315					320	
				325					
ATT	AAG	CAA	GCA	AAC	CAG	GAA	TGC	TCA	
AAT	GAA	AGT	AGA	ATT	GTA	ACT		1122	
Ile	Lys	Gln	Ala	Asn	Gln	Glu	Cys	Ser	
Asn	Glu	Ser	Arg	Ile	Val	Thr			
		330					335		
			340						
GTC	CAT	AAA	CAA	GAT	GGT	AAA	GTT	TTG	
GAG	ATA	GAA	CTT	AGC	TCA	TTA		1170	
Val	His	Lys	Gln	Asp	Gly	Lys	Val	Leu	
Glu	Ile	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu			
	345					350			
		355							
AAA	GAA	GCC	TTG	TCA	TTC	GTG	TCA	TTA	
ATT	GAC	GGG	TAT	TAC	AGA	CTA		1218	
Lys	Glu	Ala	Leu	Ser	Phe	Val	Ser	Leu	
Ile	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Leu			
360					365				
	370					375			
ACT	GCG	GAT	GCG	CAC	CAT	TAC	CTC	TGC	
AAA	GAG	GTG	GCT	CCC	CCA	GCT		1266	
Thr	Ala	Asp	Ala	His	His	Tyr	Leu	Cys	
Lys	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Ala			
				380					
385					390				
GTG	CTC	GAG	AAC	ATA	CAC	AGC	AAC	TGC	
CAC	GGC	CCA	ATA	TCA	ATG	GAT		1314	
Val	Leu	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Asn	Cys	
His	Gly	Pro	Ile	Ser	Met	Asp			
			395					400	
				405					
TTT	GCC	ATT	AGC	AAA	CTA	AAG	AAG	GCG	
GGT	AAC	CAG	ACT	GGA	CTA	TAT		1362	
Phe	Ala	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Lys	Ala	
Gly	Asn	Gln	Thr	Gly	Leu	Tyr			

88

			410			415		
			420					
GTG	CTA	CGA	TGC	AGC	CCT	AAG	GAC	TTC
AAC	AAA	TAC	TTT	CTG	ACC	TTT		1410
Val	Leu	Arg	Cys	Ser	Pro	Lys	Asp	Phe
Asn	Lys	Tyr	Phe	Leu	Thr	Phe		
425						430		
			435					
GCT	GTT	GAG	CGA	GAA	AAT	GTC	ATT	GAA
TAT	AAA	CAC	TGT	TTG	ATT	ACG		1458
Ala	Val	Glu	Arg	Glu	Asn	Val	Ile	Glu
Tyr	Lys	His	Cys	Leu	Ile	Thr		
440						445		
450						455		
AAG	AAT	GAG	AAT	GGA	GAA	TAC	AAC	CTC
AGC	GGG	ACT	AAG	AGG	AAC	TTC		1506
Lys	Asn	Glu	Asn	Gly	Glu	Tyr	Asn	Leu
Ser	Gly	Thr	Lys	Arg	Asn	Phe		
			460					
465						470		
AGT	AAC	CTT	AAG	GAC	CTT	TTG	AAT	TGC
TAC	CAG	ATG	GAA	ACT	GTG	CGC		1554
Ser	Asn	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Asn	Cys
Tyr	Gln	Met	Glu	Thr	Val	Arg		
			475			480		
			485					
TCA	GAC	AGT	ATC	ATC	TTC	CAG	TTT	ACC
AAA	TGC	TGC	CCC	CCA	AAG	CCA		1602
Ser	Asp	Ser	Ile	Ile	Phe	Gln	Phe	Thr
Lys	Cys	Cys	Pro	Pro	Lys	Pro		
490						495		
			500					
AAA	GAT	AAA	TCA	AAC	CTT	CTC	GTC	TTC
AGA	ACA	AAT	GGT	ATT	TCT	GAT		1650
Lys	Asp	Lys	Ser	Asn	Leu	Leu	Val	Phe
Arg	Thr	Asn	Gly	Ile	Ser	Asp		
505						510		
			515					
GTT	CAG	ATC	TCA	CCA	ACA	TTA	CAG	AGG
CAT	AAT	AAT	GTG	AAT	CAA	ATG		1698
Val	Gln	Ile	Ser	Pro	Thr	Leu	Gln	Arg
His	Asn	Asn	Val	Asn	Gln	Met		
520						525		
530						535		
GTG	TTT	CAC	AAA	ATC	AGG	AAT	GAA	GAT
TTA	ATA	TTT	AAT	GAA	AGT	CTT		1746
Val	Phe	His	Lys	Ile	Arg	Asn	Glu	Asp
Leu	Ile	Phe	Asn	Glu	Ser	Leu		
			540					
545						550		

89						90			
GGC	CAA	GGT	ACT	TTT	ACA	AAA	ATT	TTT	
AAA	GGT	GTA	AGA	AGA	GAA	GTT		1794	
Gly	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Lys	Ile	Phe	
Lys	Gly	Val	Arg	Arg	Glu	Val			
			555					560	
				565					
GGA	GAT	TAT	GGT	CAA	CTG	CAC	AAA	ACG	
GAA	GTT	CTT	TTG	AAA	GTC	CTA		1842	
Gly	Asp	Tyr	Gly	Gln	Leu	His	Lys	Thr	
Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Val	Leu			
		570					575		
			580						
GAT	AAA	GCA	CAT	AGG	AAC	TAT	TCA	GAG	
TCT	TTC	TTC	GAA	GCA	GCA	AGC		1890	
Asp	Lys	Ala	His	Arg	Asn	Tyr	Ser	Glu	
Ser	Phe	Phe	Glu	Ala	Ala	Ser			
	585					590			
		595							
ATG	ATG	AGT	CAG	CTT	TCT	CAC	AAG	CAT	
TTG	GTT	TTG	AAT	TAT	GGT	GTC		1938	
Met	Met	Ser	Gln	Leu	Ser	His	Lys	His	
Leu	Val	Leu	Asn	Tyr	Gly	Val			
600					605				
	610					615			
TGT	GTC	TGT	GGA	GAG	GAG	AAC	ATT	CTG	
GTT	CAA	GAA	TTT	GTA	AAA	TTT		1986	
Cys	Val	Cys	Gly	Glu	Glu	Asn	Ile	Leu	
Val	Gln	Glu	Phe	Val	Lys	Phe			
			620						
625					630				
GGA	TCA	CTG	GAT	ACA	TAC	CTG	AAG	AAG	
AAC	AAA	AAT	TCC	ATA	AAT	ATA		2034	
Gly	Ser	Leu	Asp	Thr	Tyr	Leu	Lys	Lys	
Asn	Lys	Asn	Ser	Ile	Asn	Ile			
			635					640	
				645					
TTA	TGG	AAA	CTT	GGA	GTG	GCT	AAG	CAG	
TTG	GCA	TGG	GCC	ATG	CAT	TTT		2082	
Leu	Trp	Lys	Leu	Gly	Val	Ala	Lys	Gln	
Leu	Ala	Trp	Ala	Met	His	Phe			
		650					655		
			660						
CTA	GAA	GAA	AAA	TCC	CTT	ATT	CAT	GGG	
AAT	GTG	TGT	GCT	AAA	AAT	ATC		2130	
Leu	Glu	Glu	Lys	Ser	Leu	Ile	His	Gly	
Asn	Val	Cys	Ala	Lys	Asn	Ile			
	665					670			
		675							
CTG	CTT	ATC	AGA	GAA	GAA	GAC	AGG	AGA	
ACG	GGG	AAC	CCA	CCT	TTC	ATC		2178	

91						92			
Leu	Leu	Ile	Arg	Glu	Glu	Asp	Arg	Arg	
Thr	Gly	Asn	Pro	Pro	Phe	Ile			
680					685				
	690					695			
AAA	CTT	AGT	GAT	CCT	GGC	ATT	AGC	ATT	
ACA	GTT	CTA	CCG	AAG	GAC	ATT		2226	
Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	Gly	Ile	Ser	Ile	
Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile			
				700					
705					710				
CTT	CAG	GAG	AGA	ATA	CCA	TGG	GTA	CCT	
CCT	GAA	TGC	ATT	GAG	AAT	CCT		2274	
Leu	Gln	Glu	Arg	Ile	Pro	Trp	Val	Pro	
Pro	Glu	Cys	Ile	Glu	Asn	Pro			
			715					720	
				725					
AAA	AAT	CTC	AAT	CTG	GCA	ACA	GAC	AAG	
TGG	AGC	TTC	GGG	ACC	ACT	CTG		2322	
Lys	Asn	Leu	Asn	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys	
Trp	Ser	Phe	Gly	Thr	Thr	Leu			
		730					735		
			740						
TGG	GAG	ATC	TGC	AGT	GGA	GGA	GAT	AAG	
CCC	CTG	AGT	GCT	CTG	GAT	TCT		2370	
Trp	Glu	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys	
Pro	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Ser			
	745					750			
		755							
CAA	AGA	AAG	CTG	CAG	TTC	TAT	GAA	GAT	
AAG	CAT	CAG	CTT	CCT	GCA	CCC		2418	
Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Phe	Tyr	Glu	Asp	
Lys	His	Gln	Leu	Pro	Ala	Pro			
760					765				
	770					775			
AAG	TGG	ACA	GAG	TTA	GCA	AAC	CTT	ATA	
AAT	AAT	TGC	ATG	GAC	TAT	GAG		2466	
Lys	Trp	Thr	Glu	Leu	Ala	Asn	Leu	Ile	
Asn	Asn	Cys	Met	Asp	Tyr	Glu			
				780					
785					790				
CCA	GAT	TTC	AGG	CCT	GCT	TTC	AGA	GCT	
GTC	ATC	CGT	GAT	CTT	AAC	AGC		2514	
Pro	Asp	Phe	Arg	Pro	Ala	Phe	Arg	Ala	
Val	Ile	Arg	Asp	Leu	Asn	Ser			
			795					800	
				805					
CTG	TTT	ACT	CCA	GAT	TAT	GAA	CTA	CTA	
ACA	GAA	AAT	GAC	ATG	CTA	CCA		2562	
Leu	Phe	Thr	Pro	Asp	Tyr	Glu	Leu	Leu	
Thr	Glu	Asn	Asp	Met	Leu	Pro			

93

94

810										815									
820																			
AAC	ATG	AGA	ATA	GGT	GCC	CTA	GGG	TTT											
TCT	GGT	GCT	TTT	GAA	GAC	AGG			2610										
Asn	Met	Arg	Ile	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe											
Ser	Gly	Ala	Phe	Glu	Asp	Arg													
825										830									
835																			
GAC	CCT	ACA	CAG	TTT	GAA	GAG	AGA	CAC											
TTG	AAG	TTT	CTA	CAG	CAG	CTT		2658											
Asp	Pro	Thr	Gln	Phe	Glu	Glu	Arg	His											
Leu	Lys	Phe	Leu	Gln	Gln	Leu													
840										845									
850										855									
GGC	AAA	GGT	AAC	TTC	GGG	AGT	GTG	GAG											
ATG	TGC	CGC	TAT	GAC	CCG	CTG		2706											
Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Gly	Ser	Val	Glu											
Met	Cys	Arg	Tyr	Asp	Pro	Leu													
860										865									
CAG	GAC	AAC	ACT	GGC	GAG	GTG	GTC	GCT											
GTG	AAG	AAA	CTC	CAG	CAC	AGC		2754											
Gln	Asp	Asn	Thr	Gly	Glu	Val	Val	Ala											
Val	Lys	Lys	Leu	Gln	His	Ser													
870										875									
880										885									
ACT	GAA	GAG	CAC	CTC	CGA	GAC	TTT	GAG											
AGG	GAG	ATC	GAG	ATC	CTG	AAA		2802											
Thr	Glu	Glu	His	Leu	Arg	Asp	Phe	Glu											
Arg	Glu	Ile	Glu	Ile	Leu	Lys													
890										895									
900										905									
TCC	TTG	CAG	CAT	GAC	AAC	ATC	GTC	AAG											
TAC	AAG	GGA	GTG	TGC	TAC	AGT		2850											
Ser	Leu	Gln	His	Asp	Asn	Ile	Val	Lys											
Tyr	Lys	Gly	Val	Cys	Tyr	Ser													
910										915									
GCG	GGT	CGG	CGC	AAC	CTA	AGA	TTA	ATT											
ATG	GAA	TAT	TTA	CCA	TAT	GGA		2898											
Ala	Gly	Arg	Arg	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile											
Met	Glu	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Gly													
920										925									
930										935									
AGT	TTA	CGA	GAC	TAT	CTC	CAA	AAA	CAT											
AAA	GAA	CGG	ATA	GAT	CAC	AAA		2946											
Ser	Leu	Arg	Asp	Tyr	Leu	Gln	Lys	His											
Lys	Glu	Arg	Ile	Asp	His	Lys													
940										945									
950										955									

95					96				
AAA	CTT	CTT	CAA	TAC	ACA	TCT	CAG	ATA	
TGC	AAG	GGC	ATG	GAA	TAT	CTT		2994	
Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	Thr	Ser	Gln	Ile	
Cys	Lys	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu			
			955					960	
				965					
GGT	ACA	AAA	AGG	TAT	ATC	CAC	AGG	GAC	
CTG	GCA	ACA	AGG	AAC	ATA	TTG		3042	
Gly	Thr	Lys	Arg	Tyr	Ile	His	Arg	Asp	
Leu	Ala	Thr	Arg	Asn	Ile	Leu			
		970					975		
			980						
GTG	GAA	AAT	GAG	AAC	AGG	GTT	AAA	ATA	
GGA	GAC	TTC	GGA	TTA	ACC	AAA		3090	
Val	Glu	Asn	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Ile	
Gly	Asp	Phe	Gly	Leu	Thr	Lys			
	985					990			
		995							
GTC	TTG	CCG	CAG	GAC	AAA	GAA	TAC	TAC	
AAA	GTA	AAG	GAG	CCA	GGG	GAA		3138	
Val	Leu	Pro	Gln	Asp	Lys	Glu	Tyr	Tyr	
Lys	Val	Lys	Glu	Pro	Gly	Glu			
1000					1005				
	1010					1015			
AGC	CCC	ATA	TTC	TGG	TAC	GCA	CCT	GAA	
TCC	TTG	ACG	GAG	AGC	AAG	TTT		3186	
Ser	Pro	Ile	Phe	Trp	Tyr	Ala	Pro	Glu	
Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Lys	Phe			
			1020						
1025				1030					
TCT	GTG	GCC	TCA	GAT	GTG	TGG	AGC	TTT	
GGA	GTG	GTT	CTA	TAC	GAA	CTT		3234	
Ser	Val	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	
Gly	Val	Val	Leu	Tyr	Glu	Leu			
			1035					1040	
			1045						
TTC	ACA	TAC	ATC	GAG	AAG	AGT	AAA	AGT	
CCA	CCC	GTG	GAA	TTT	ATG	CGA		3282	
Phe	Thr	Tyr	Ile	Glu	Lys	Ser	Lys	Ser	
Pro	Pro	Val	Glu	Phe	Met	Arg			
		1050					1055		
		1060							
ATG	ATT	GGC	AAT	GAT	AAA	CAA	GGG	CAA	
ATG	ATT	GTG	TTC	CAT	TTG	ATA		3330	
Met	Ile	Gly	Asn	Asp	Lys	Gln	Gly	Gln	
Met	Ile	Val	Phe	His	Leu	Ile			
	1065					1070			
		1075							
GAG	CTA	CTG	AAG	AGC	AAC	GGA	AGA	TTG	
CCA	AGG	CCA	GAA	GGA	TGC	CCA		3378	

97

98

```

Glu Leu Leu Lys Ser Asn Gly Arg Leu
Pro Arg Pro Glu Gly Cys Pro
1080                      1085
          1090                      1095
GAT GAG ATT TAT GTG ATC ATG ACA GAG
TGC TGG AAC AAC AAT GTG AGC          3426
Asp Glu Ile Tyr Val Ile Met Thr Glu
Cys Trp Asn Asn Asn Val Ser
                      1100
1105                      1110
CAG CGT CCC TCC TTC AGG GAC CTT TCG
TTC GGG TGG ATC AAA TCC GGG          3474
Gln Arg Pro Ser Phe Arg Asp Leu Ser
Phe Gly Trp Ile Lys Ser Gly
                      1115                      1120
                      1125
ACA GTA TAGCTGCGTG AAAGAGATGG CCTTCA
CTCA GAGACCAAGC AGACTTCCAG          3530
Thr Val
AACCAGAACA AAGCTCTGTA GCCTTGTGTC TAC
ACATCCT TATCATGATG CTAGCTAGGC          3590
AGAAGAACT GTGACGCCGT CTGCTCAAAG CTT
TGCTTC          3629

```

【0201】配列番号9:

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 1129

配列の種類: プロテイン

配列の型: アミノ酸

配列

```

Met Gly Met Ala Cys Leu Thr Met Thr Glu Met Glu Ala Thr Ser Thr
 1              5              10              15
Ser Pro Val His Gln Asn Gly Asp Ile Pro Gly Ser Ala Asn Ser Val
          20              25              30
Lys Gln Ile Glu Pro Val Leu Gln Val Tyr Leu Tyr His Ser Leu Gly
          35              40              45
Gln Ala Glu Gly Glu Tyr Leu Lys Phe Pro Ser Gly Glu Tyr Val Ala
          50              55              60
Glu Glu Ile Cys Val Ala Ala Ser Lys Ala Cys Gly Ile Thr Pro Val
          65              70              75              80
Tyr His Asn Met Phe Ala Leu Met Ser Glu Thr Glu Arg Ile Trp Tyr
          85              90              95
Pro Pro Asn His Val Phe His Ile Asp Glu Ser Thr Arg His Asp Ile
          100              105              110
Leu Tyr Arg Ile Arg Phe Tyr Phe Pro His Trp Tyr Cys Ser Gly Ser
          115              120              125
Ser Arg Thr Tyr Arg Tyr Gly Val Ser Arg Gly Ala Glu Ala Pro Leu
          130              135              140
Leu Asp Asp Phe Val Met Ser Tyr Leu Phe Ala Gln Trp Arg His Asp
          145              150              155              160
Phe Val His Gly Trp Ile Lys Val Pro Val Thr His Glu Thr Gln Glu
          165              170              175
Glu Cys Leu Gly Met Ala Val Leu Asp Met Met Arg Ile Ala Lys Glu

```

180	185	190
Lys Asp Gln Thr Pro Leu Ala Val Tyr Asn Ser Val Ser Tyr Lys Thr		
195	200	205
Phe Leu Pro Lys Cys Val Arg Ala Lys Ile Gln Asp Tyr His Ile Leu		
210	215	220
Thr Arg Lys Arg Ile Arg Tyr Arg Phe Arg Arg Phe Ile Gln Gln Phe		
225	230	235
Ser Gln Cys Lys Ala Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu Lys Tyr Leu Ile		
245	250	255
Asn Leu Glu Thr Leu Gln Ser Ala Phe Tyr Thr Glu Gln Phe Glu Val		
260	265	270
Lys Glu Ser Ala Arg Gly Pro Ser Gly Glu Glu Ile Phe Ala Thr Ile		
275	280	285
Ile Ile Thr Gly Asn Gly Gly Ile Gln Trp Ser Arg Gly Lys His Lys		
290	295	300
Glu Ser Glu Thr Leu Thr Glu Gln Asp Val Gln Leu Tyr Cys Asp Phe		
305	310	315
Pro Asp Ile Ile Asp Val Ser Ile Lys Gln Ala Asn Gln Glu Cys Ser		
325	330	335
Asn Glu Ser Arg Ile Val Thr Val His Lys Gln Asp Gly Lys Val Leu		
340	345	350
Glu Ile Glu Leu Ser Ser Leu Lys Glu Ala Leu Ser Phe Val Ser Leu		
355	360	365
Ile Asp Gly Tyr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Ala His His Tyr Leu Cys		
370	375	380
Lys Glu Val Ala Pro Pro Ala Val Leu Glu Asn Ile His Ser Asn Cys		
385	390	395
His Gly Pro Ile Ser Met Asp Phe Ala Ile Ser Lys Leu Lys Lys Ala		
405	410	415
Gly Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Val Leu Arg Cys Ser Pro Lys Asp Phe		
420	425	430
Asn Lys Tyr Phe Leu Thr Phe Ala Val Glu Arg Glu Asn Val Ile Glu		
435	440	445
Tyr Lys His Cys Leu Ile Thr Lys Asn Glu Asn Gly Glu Tyr Asn Leu		
450	455	460
Ser Gly Thr Lys Arg Asn Phe Ser Asn Leu Lys Asp Leu Leu Asn Cys		
465	470	475
Tyr Gln Met Glu Thr Val Arg Ser Asp Ser Ile Ile Phe Gln Phe Thr		
485	490	495
Lys Cys Cys Pro Pro Lys Pro Lys Asp Lys Ser Asn Leu Leu Val Phe		
500	505	510
Arg Thr Asn Gly Ile Ser Asp Val Gln Ile Ser Pro Thr Leu Gln Arg		
515	520	525
His Asn Asn Val Asn Gln Met Val Phe His Lys Ile Arg Asn Glu Asp		
530	535	540
Leu Ile Phe Asn Glu Ser Leu Gly Gln Gly Thr Phe Thr Lys Ile Phe		
545	550	555
Lys Gly Val Arg Arg Glu Val Gly Asp Tyr Gly Gln Leu His Lys Thr		
565	570	575
Glu Val Leu Leu Lys Val Leu Asp Lys Ala His Arg Asn Tyr Ser Glu		

101

102

	580		585		590										
Ser	Phe	Phe	Glu	Ala	Ala	Ser	Met	Met	Ser	Gln	Leu	Ser	His	Lys	His
	595						600					605			
Leu	Val	Leu	Asn	Tyr	Gly	Val	Cys	Val	Cys	Gly	Glu	Glu	Asn	Ile	Leu
	610					615					620				
Val	Gln	Glu	Phe	Val	Lys	Phe	Gly	Ser	Leu	Asp	Thr	Tyr	Leu	Lys	Lys
625					630					635				640	
Asn	Lys	Asn	Ser	Ile	Asn	Ile	Leu	Trp	Lys	Leu	Gly	Val	Ala	Lys	Gln
			645					650					655		
Leu	Ala	Trp	Ala	Met	His	Phe	Leu	Glu	Glu	Lys	Ser	Leu	Ile	His	Gly
		660					665						670		
Asn	Val	Cys	Ala	Lys	Asn	Ile	Leu	Leu	Ile	Arg	Glu	Glu	Asp	Arg	Arg
		675					680						685		
Thr	Gly	Asn	Pro	Pro	Phe	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	Gly	Ile	Ser	Ile
	690					695						700			
Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Leu	Gln	Glu	Arg	Ile	Pro	Trp	Val	Pro
705				710						715				720	
Pro	Glu	Cys	Ile	Glu	Asn	Pro	Lys	Asn	Leu	Asn	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys
			725					730					735		
Trp	Ser	Phe	Gly	Thr	Thr	Leu	Trp	Glu	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys
		740					745						750		
Pro	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Ser	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Phe	Tyr	Glu	Asp
	755						760					765			
Lys	His	Gln	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Trp	Thr	Glu	Leu	Ala	Asn	Leu	Ile
	770				775							780			
Asn	Asn	Cys	Met	Asp	Tyr	Glu	Pro	Asp	Phe	Arg	Pro	Ala	Phe	Arg	Ala
785				790						795				800	
Val	Ile	Arg	Asp	Leu	Asn	Ser	Leu	Phe	Thr	Pro	Asp	Tyr	Glu	Leu	Leu
			805						810				815		
Thr	Glu	Asn	Asp	Met	Leu	Pro	Asn	Met	Arg	Ile	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe
		820							825				830		
Ser	Gly	Ala	Phe	Glu	Asp	Arg	Asp	Pro	Thr	Gln	Phe	Glu	Glu	Arg	His
	835						840					845			
Leu	Lys	Phe	Leu	Gln	Gln	Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Gly	Ser	Val	Glu
	850					855						860			
Met	Cys	Arg	Tyr	Asp	Pro	Leu	Gln	Asp	Asn	Thr	Gly	Glu	Val	Val	Ala
865					870					875				880	
Val	Lys	Lys	Leu	Gln	His	Ser	Thr	Glu	Glu	His	Leu	Arg	Asp	Phe	Glu
			885						890				895		
Arg	Glu	Ile	Glu	Ile	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	His	Asp	Asn	Ile	Val	Lys
		900							905				910		
Tyr	Lys	Gly	Val	Cys	Tyr	Ser	Ala	Gly	Arg	Arg	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile
	915					920						925			
Met	Glu	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ser	Leu	Arg	Asp	Tyr	Leu	Gln	Lys	His
	930					935						940			
Lys	Glu	Arg	Ile	Asp	His	Lys	Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	Thr	Ser	Gln	Ile
945					950					955				960	
Cys	Lys	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Gly	Thr	Lys	Arg	Tyr	Ile	His	Arg	Asp
			965						970				975		
Leu	Ala	Thr	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Glu	Asn	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Ile

103

104

980	985	990
Gly Asp Phe Gly Leu Thr Lys Val Leu Pro Gln Asp Lys Glu Tyr Tyr		
995	1000	1005
Lys Val Lys Glu Pro Gly Glu Ser Pro Ile Phe Trp Tyr Ala Pro Glu		
1010	1015	1020
Ser Leu Thr Glu Ser Lys Phe Ser Val Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe		
1025	1030	1035
Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr Ile Glu Lys Ser Lys Ser		
1045	1050	1055
Pro Pro Val Glu Phe Met Arg Met Ile Gly Asn Asp Lys Gln Gly Gln		
1060	1065	1070
Met Ile Val Phe His Leu Ile Glu Leu Leu Lys Ser Asn Gly Arg Leu		
1075	1080	1085
Pro Arg Pro Glu Gly Cys Pro Asp Glu Ile Tyr Val Ile Met Thr Glu		
1090	1095	1100
Cys Trp Asn Asn Asn Val Ser Gln Arg Pro Ser Phe Arg Asp Leu Ser		
1105	1110	1115
Phe Gly Trp Ile Lys Ser Gly Thr Val		
1125		

【0202】配列番号10:

配列の長さ: 3429塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

20 トポロジー: 直鎖状

配列の特徴

特徴を表す記号: C D S

存在位置: 1..3426

配列

ATG GCT TTC TGT GCT AAA ATG AGG AGC TCC AAG AAG ACT GAG GTG AAC	48
Met Ala Phe Cys Ala Lys Met Arg Ser Ser Lys Lys Thr Glu Val Asn	
1 5 10 15	
CTG GAG GCC CCT GAG CCA GGG GTG GAA GTG ATC TTC TAT CTG TCG GAC	96
Leu Glu Ala Pro Glu Pro Gly Val Glu Val Ile Phe Tyr Leu Ser Asp	
20 25 30	
AGG GAG CCC CTC CGG CTG GGC AGT GGA GAG TAC ACA GCA GAG GAA CTG	144
Arg Glu Pro Leu Arg Leu Gly Ser Gly Glu Tyr Thr Ala Glu Glu Leu	
35 40 45	
TGC ATC AGG GCT GCA CAG GCA TGC CGT ATC TCT CCT CTT TGT CAC AAC	192
Cys Ile Arg Ala Ala Gln Ala Cys Arg Ile Ser Pro Leu Cys His Asn	
50 55 60	
CTC TTT GCC CTG TAT GAC GAG AAC ACC AAG CTC TGG TAT GCT CCA AAT	240
Leu Phe Ala Leu Tyr Asp Glu Asn Thr Lys Leu Trp Tyr Ala Pro Asn	
65 70 75 80	
CGC ACC ATC ACC GTT GAT GAC AAG ATG TCC CTC CGG CTC CAC TAC CGG	288
Arg Thr Ile Thr Val Asp Asp Lys Met Ser Leu Arg Leu His Tyr Arg	
85 90 95	
ATG AGG TTC TAT TTC ACC AAT TGG CAT GCA ACC AAC GAC AAT GAG CAG	336
Met Arg Phe Tyr Phe Thr Asn Trp His Gly Thr Asn Asp Asn Glu Gln	
100 105 110	
TCA GTG TGG CGT CAT TCT CCA AAG AAG CAG AAA AAT GGC TAC GAG AAA	384
Ser Val Trp Arg His Ser Pro Lys Lys Gln Lys Asn Gly Tyr Glu Lys	
115 120 125	
AAA AAG ATT CCA GAT GCA ACC CCT CTC CTT GAT GCC AGC TCA CTG GAG	432
Lys Lys Ile Pro Asp Ala Thr Pro Leu Leu Asp Ala Ser Ser Leu Glu	

105	106
130	135
TAT CTG TTT GCT CAG GGA CAG TAT GAT TTG GTG AAA TGC CTG GCT CCT	480
Tyr Leu Phe Ala Gln Gly Gln Tyr Asp Leu Val Lys Cys Leu Ala Pro	
145	150
ATT CGA GAC CCC AAG ACC GAG CAG GAT GGA CAT GAT ATT GAG AAC GAG	528
Ile Arg Asp Pro Lys Thr Glu Gln Asp Gly His Asp Ile Glu Asn Glu	
165	170
TGT CTA GGG ATG GCT GTC CTG GCC ATC TCA CAC TAT GCC ATG ATG AAG	576
Cys Leu Gly Met Ala Val Leu Ala Ile Ser His Tyr Ala Met Met Lys	
180	185
AAG ATG CAG TTG CCA GAA CTG CCC AAG GAC ATC AGC TAC AAG CGA TAT	624
Lys Met Gln Leu Pro Glu Leu Pro Lys Asp Ile Ser Tyr Lys Arg Tyr	
195	200
ATT CCA GAA ACA TTG AAT AAG TCC ATC AGA CAG AGG AAC CTT CTC ACC	672
Ile Pro Glu Thr Leu Asn Lys Ser Ile Arg Gln Arg Asn Leu Leu Thr	
210	215
AGG ATG CGG ATA AAT AAT GTT TTC AAG GAT TTC CTA AAG GAA TTT AAC	720
Arg Met Arg Ile Asn Asn Val Phe Lys Asp Phe Leu Lys Glu Phe Asn	
225	230
AAC AAG ACC ATT TGT GAC AGC AGC GTG TCC ACG CAT GAC CTG AAG GTG	768
Asn Lys Thr Ile Cys Asp Ser Ser Val Ser Thr His Asp Leu Lys Val	
245	250
AAA TAC TTG GCT ACC TTG GAA ACT TTG ACA AAA CAT TAC GGT GCT GAA	816
Lys Tyr Leu Ala Thr Leu Glu Thr Leu Thr Lys His Tyr Gly Ala Glu	
260	265
ATA TTT GAG ACT TCC ATG TTA CTG ATT TCA TCA GAA AAT GAG ATG AAT	864
Ile Phe Glu Thr Ser Met Leu Leu Ile Ser Ser Glu Asn Glu Met Asn	
275	280
TGG TTT CAT TCG AAT GAC GGT GGA AAC GTT CTC TAC TAC GAA GTG ATG	912
Trp Phe His Ser Asn Asp Gly Gly Asn Val Leu Tyr Tyr Glu Val Met	
290	295
GTG ACT GGG AAT CTT GGA ATC CAG TGG AGG CAT AAA CCA AAT GTT GTT	960
Val Thr Gly Asn Leu Gly Ile Gln Trp Arg His Lys Pro Asn Val Val	
305	310
TCT GTT GAA AAG GAA AAA AAT AAA CTG AAG CGG AAA AAA CTG GAA AAT	1008
Ser Val Glu Lys Glu Lys Asn Lys Leu Lys Arg Lys Lys Leu Glu Asn	
325	330
AAA GAC AAG AAG GAT GAG GAG AAA AAC AAG ATC CGG GAA GAG TGG AAC	1056
Lys Asp Lys Lys Asp Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Glu Trp Asn	
340	345
AAT TTT TCA TTC TTC CCT GAA ATC ACT CAC ATT GTA ATA AAG GAG TCT	1104
Asn Phe Ser Phe Phe Pro Glu Ile Thr His Ile Val Ile Lys Glu Ser	
355	360
GTG GTC AGC ATT AAC AAG CAG GAC AAC AAG AAA ATG GAA CTG AAG CTC	1152
Val Val Ser Ile Asn Lys Gln Asp Asn Lys Lys Met Glu Leu Lys Leu	
370	375
TCT TCC CAC GAG GAG GCC TTG TCC TTT GTG TCC CTG GTA GAT GGC TAC	1200
Ser Ser His Glu Glu Ala Leu Ser Phe Val Ser Leu Val Asp Gly Tyr	
385	390
TTC CGG CTC ACA GCA GAT GCC CAT CAT TAC CTC TGC ACC GAC GTG GCC	1248
	400

107	108
Phe Arg Leu Thr Ala Asp Ala His His Tyr Leu Cys Thr Asp Val Ala	
405 410 415	
CCC CCG TTG ATC GTC CAC AAC ATA CAG AAT GGC TGT CAT GGT CCA ATC	1296
Pro Pro Leu Ile Val His Asn Ile Gln Asn Gly Cys His Gly Pro Ile	
420 425 430	
TGT ACA GAA TAC GCC ATC AAT AAA TTG CGG CAA GAA GGA AGC GAG GAG	1344
Cys Thr Glu Tyr Ala Ile Asn Lys Leu Arg Gln Glu Gly Ser Glu Glu	
435 440 445	
GGG ATG TAC GTG CTG AGG TGG AGC TGC ACC GAC TTT GAC AAC ATC CTC	1392
Gly Met Tyr Val Leu Arg Trp Ser Cys Thr Asp Phe Asp Asn Ile Leu	
450 455 460	
ATG ACC GTC ACC TGC TTT GAG AAG TCT GAG CAG GTG CAG GGT GCC CAG	1440
Met Thr Val Thr Cys Phe Glu Lys Ser Glu Gln Val Gln Gly Ala Gln	
465 470 475 480	
AAG CAG TTC AAG AAC TTT CAG ATC GAG GTG CAG AAG GGC CGC TAC AGT	1488
Lys Gln Phe Lys Asn Phe Gln Ile Glu Val Gln Lys Gly Arg Tyr Ser	
485 490 495	
CTG CAC GGT TCG GAC CGC AGC TTC CCC AGC TTG GGA GAC CTC ATG AGC	1536
Leu His Gly Ser Asp Arg Ser Phe Pro Ser Leu Gly Asp Leu Met Ser	
500 505 510	
CAC CTC AAG AAG CAG ATC CTG CGC ACG GAT AAC ATC AGC TTC ATG CTA	1584
His Leu Lys Lys Gln Ile Leu Arg Thr Asp Asn Ile Ser Phe Met Leu	
515 520 525	
AAA CGC TGC TGC CAG CCC AAG CCC CGA GAA ATC TCC AAC CTG CTG GTG	1632
Lys Arg Cys Cys Gln Pro Lys Pro Arg Glu Ile Ser Asn Leu Leu Val	
530 535 540	
GCT ACT AAG AAA GCC CAG GAG TGG CAG CCC GTC TAC CCC ATG AGC CAG	1680
Ala Thr Lys Lys Ala Gln Glu Trp Gln Pro Val Tyr Pro Met Ser Gln	
545 550 555 560	
CTG AGT TTC GAT CGG ATC CTC AAG AAG GAT CTG GTG CAG GGC GAG CAC	1728
Leu Ser Phe Asp Arg Ile Leu Lys Lys Asp Leu Val Gln Gly Glu His	
565 570 575	
CTT GGG AGA GGC ACG AGA ACA CAC ATC TAT TCT GGG ACC CTG ATG GAT	1776
Leu Gly Arg Gly Thr Arg Thr His Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Met Asp	
580 585 590	
TAC AAG GAT GAC GAA GGA ACT TCT GAA GAG AAG AAG ATA AAA GTG ATC	1824
Tyr Lys Asp Asp Glu Gly Thr Ser Glu Glu Lys Lys Ile Lys Val Ile	
595 600 605	
CTC AAA GTC TTA GAC CCC AGC CAC AGG GAT ATT TCC CTG GCC TTC TTC	1872
Leu Lys Val Leu Asp Pro Ser His Arg Asp Ile Ser Leu Ala Phe Phe	
610 615 620	
GAG GCA GCC AGC ATG ATG AGA CAG GTC TCC CAC AAA CAC ATC GTG TAC	1920
Glu Ala Ala Ser Met Met Arg Gln Val Ser His Lys His Ile Val Tyr	
625 630 635 640	
CTC TAT GGC GTC TGT GTC CGC GAC GTG GAG AAT ATC ATG GTG GAA GAG	1968
Leu Tyr Gly Val Cys Val Arg Asp Val Glu Asn Ile Met Val Glu Glu	
645 650 655	
TTT GTG GAA GGG GGT CCT CTG GAT CTC TTC ATG CAC CGG AAA AGT GAT	2016
Phe Val Glu Gly Gly Pro Leu Asp Leu Phe Met His Arg Lys Ser Asp	
660 665 670	

109	110
GTC CTT ACC ACA CCA TGG AAA TTC AAA GTT GCC AAA CAG CTG GCC AGT Val Leu Thr Thr Pro Trp Lys Phe Lys Val Ala Lys Gln Leu Ala Ser 675 680 685	2064
GCC CTG AGC TAC TTG GAG GAT AAA GAC CTG GTC CAT GGA AAT GTG TGT Ala Leu Ser Tyr Leu Glu Asp Lys Asp Leu Val His Gly Asn Val Cys 690 695 700	2112
ACT AAA AAC CTC CTC CTG GCC CGT GAG GGA ATC GAC AGT GAG TGT GGC Thr Lys Asn Leu Leu Leu Ala Arg Glu Gly Ile Asp Ser Glu Cys Gly 705 710 715 720	2160
CCA TTC ATC AAG CTC AGT GAC CCC GGC ATC CCC ATT ACG GTG CTG TCT Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Ile Pro Ile Thr Val Leu Ser 725 730 735	2208
AGG CAA GAA TGC ATT GAA CGA ATC CCA TGG ATT GCT CCT GAG TGT GTT Arg Gln Glu Cys Ile Glu Arg Ile Pro Trp Ile Ala Pro Glu Cys Val 740 745 750	2256
GAG GAC TCC AAG AAC CTG AGT GTG GCT GCT GAC AAG TGG AGC TTT GGA Glu Asp Ser Lys Asn Leu Ser Val Ala Ala Asp Lys Trp Ser Phe Gly 755 760 765	2304
ACC ACG CTC TGG GAA ATC TGC TAC AAT GGC GAG ATC CCC TTG AAA GAC Thr Thr Leu Trp Glu Ile Cys Tyr Asn Gly Glu Ile Pro Leu Lys Asp 770 775 780	2352
AAG ACG CTG ATT GAG AAA GAG AGA TTC TAT GAA AGC CGG TGC AGG CCA Lys Thr Leu Ile Glu Lys Glu Arg Phe Tyr Glu Ser Arg Cys Arg Pro 785 790 795 800	2400
GTG ACA CCA TCA TGT AAG GAG CTG GCT GAC CTC ATG ACC CGC TGC ATG Val Thr Pro Ser Cys Lys Glu Leu Ala Asp Leu Met Thr Arg Cys Met 805 810 815	2448
AAC TAT GAC CCC AAT CAG AGG CCT TTC TTC CGA GCC ATC ATG AGA GAC Asn Tyr Asp Pro Asn Gln Arg Pro Phe Phe Arg Ala Ile Met Arg Asp 820 825 830	2496
ATT AAT AAG CTT GAA GAG CAG AAT CCA GAT ATT GTT TCC AGA AAA AAA Ile Asn Lys Leu Glu Glu Gln Asn Pro Asp Ile Val Ser Arg Lys Lys 835 840 845	2544
AAC CAG CCA ACT GAA GTG GAC CCC ACA CAT TTT GAG AAG CGC TTC CTA Asn Gln Pro Thr Glu Val Asp Pro Thr His Phe Glu Lys Arg Phe Leu 850 855 860	2592
AAG AGG ATC CGT GAC TTG GGA GAG GGC CAC TTT GGG AAG GTT GAG CTC Lys Arg Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Glu Leu 865 870 875 880	2640
TGC AGG TAT GAC CCC GAA GAC AAT ACA GGG GAG CAG GTG GCT GTT AAA Cys Arg Tyr Asp Pro Glu Asp Asn Thr Gly Glu Gln Val Ala Val Lys 885 890 895	2688
TCT CTG AAG CCT GAG AGT GGA GGT AAC CAC ATA GCT GAT CTG AAA AAG Ser Leu Lys Pro Glu Ser Gly Gly Asn His Ile Ala Asp Leu Lys Lys 900 905 910	2736
GAA ATC GAG ATC TTA AGG AAC CTC TAT CAT GAG AAC ATT GTG AAG TAC Glu Ile Glu Ile Leu Arg Asn Leu Tyr His Glu Asn Ile Val Lys Tyr 915 920 925	2784
AAA GGA ATC TGC ACA GAA GAC GGA GGA AAT GGT ATT AAG CTC ATC ATG Lys Gly Ile Cys Thr Glu Asp Gly Gly Asn Gly Ile Lys Leu Ile Met	2832

111	112
930	935
GAA TTT CTG CCT TCG GCA AGC CTT AAG GAA TAT CTT CCA AAG AAT AAG	2880
Glu Phe Leu Pro Ser Gly Ser Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Lys Asn Lys	
945	950
AAC AAA ATA AAC CTC AAA CAG CAG CTA AAA TAT GCC GTT CAG ATT TGT	2928
Asn Lys Ile Asn Leu Lys Gln Gln Leu Lys Tyr Ala Val Gln Ile Cys	
965	970
AAG GGG ATG GAC TAT TTG GGT TCT CGG CAA TAC GTT CAC CGG GAC TTG	2976
Lys Gly Met Asp Tyr Leu Gly Ser Arg Gln Tyr Val His Arg Asp Leu	
980	985
GCA GCA AGA AAT GTC CTT GTT GAG AGT GAA CAC CAA GTC AAA ATT GGA	3024
Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Glu Ser Glu His Gln Val Lys Ile Gly	
995	1000
GAC TTC GGT TTA ACC AAA GCA ATT GAA ACC GAT AAG GAG TAT TAC ACC	3072
Asp Phe Gly Leu Thr Lys Ala Ile Glu Thr Asp Lys Glu Tyr Tyr Thr	
1010	1015
GTC AAG GAT GAC CGG GAC AGC CCT GTG TTT TGG TAT GCT CCA GAA TGT	3120
Val Lys Asp Asp Arg Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu Cys	
1025	1030
TTA ATG CAA TCT AAA TTT TAT ATT GCC TCT GAC GTC TGG TCT TTT GGA	3168
Leu Met Gln Ser Lys Phe Tyr Ile Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly	
1045	1050
GTC ACT CTG CAT GAG CTG CTG ACT TAC TGT GAT TCA GAT TCT AGT CCC	3216
Val Thr Leu His Glu Leu Leu Thr Tyr Cys Asp Ser Asp Ser Ser Pro	
1060	1065
ATG GCT TTG TTC CTG AAA ATG ATA GGC CCA ACC CAT GGC CAG ATG ACA	3264
Met Ala Leu Phe Leu Lys Met Ile Gly Pro Thr His Gly Gln Met Thr	
1075	1080
GTC ACA AGA CTT GTG AAT ACG TTA AAA GAA GGA AAA CGC CTG CCG TGC	3312
Val Thr Arg Leu Val Asn Thr Leu Lys Glu Gly Lys Arg Leu Pro Cys	
1090	1095
CCA CCT AAC TGT CCA GAT GAG GTT TAT CAG CTT ATG AGA AAA TGC TGG	3360
Pro Pro Asn Cys Pro Asp Glu Val Tyr Gln Leu Met Arg Lys Cys Trp	
1105	1110
GAA TTC CAA CCA TCC AAT CGG ACA AGC TTT CAG AAC CTT ATT GAA GGA	3408
Glu Phe Gln Pro Ser Asn Arg Thr Ser Phe Gln Asn Leu Ile Glu Gly	
1125	1130
TTT GAA GCA CTT TTA AAA TAA	3429
Phe Glu Ala Leu Leu Lys	
1140	

【0203】配列番号11:

配列の長さ: 1142

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の特徴: プロテイン

Met	Ala	Phe	Cys	Ala	Lys	Met	Arg	Ser	Ser	Lys	Lys	Thr	Glu	Val	Asn
1				5						10				15	
Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Val	Glu	Val	Ile	Phe	Tyr	Leu	Ser	Asp
				20						25				30	
Arg	Glu	Pro	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ala	Glu	Glu	Leu
				35						40				45	
Cys	Ile	Arg	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Arg	Ile	Ser	Pro	Leu	Cys	His	Asn

113

114

50 55 60
 Leu Phe Ala Leu Tyr Asp Glu Asn Thr Lys Leu Trp Tyr Ala Pro Asn
 65 70 75 80
 Arg Thr Ile Thr Val Asp Asp Lys Met Ser Leu Arg Leu His Tyr Arg
 85 90 95
 Met Arg Phe Tyr Phe Thr Asn Trp His Gly Thr Asn Asp Asn Glu Gln
 100 105 110
 Ser Val Trp Arg His Ser Pro Lys Lys Gln Lys Asn Gly Tyr Glu Lys
 115 120 125
 Lys Lys Ile Pro Asp Ala Thr Pro Leu Leu Asp Ala Ser Ser Leu Glu
 130 135 140
 Tyr Leu Phe Ala Gln Gly Gln Tyr Asp Leu Val Lys Cys Leu Ala Pro
 145 150 155 160
 Ile Arg Asp Pro Lys Thr Glu Gln Asp Gly His Asp Ile Glu Asn Glu
 165 170 175
 Cys Leu Gly Met Ala Val Leu Ala Ile Ser His Tyr Ala Met Met Lys
 180 185 190
 Lys Met Gln Leu Pro Glu Leu Pro Lys Asp Ile Ser Tyr Lys Arg Tyr
 195 200 205
 Ile Pro Glu Thr Leu Asn Lys Ser Ile Arg Gln Arg Asn Leu Leu Thr
 210 215 220
 Arg Met Arg Ile Asn Asn Val Phe Lys Asp Phe Leu Lys Glu Phe Asn
 225 230 235 240
 Asn Lys Thr Ile Cys Asp Ser Ser Val Ser Thr His Asp Leu Lys Val
 245 250 255
 Lys Tyr Leu Ala Thr Leu Glu Thr Leu Thr Lys His Tyr Gly Ala Glu
 260 265 270
 Ile Phe Glu Thr Ser Met Leu Leu Ile Ser Ser Glu Asn Glu Met Asn
 275 280 285
 Trp Phe His Ser Asn Asp Gly Gly Asn Val Leu Tyr Tyr Glu Val Met
 290 295 300
 Val Thr Gly Asn Leu Gly Ile Gln Trp Arg His Lys Pro Asn Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Glu Lys Glu Lys Asn Lys Leu Lys Arg Lys Lys Leu Glu Asn
 325 330 335
 Lys Asp Lys Lys Asp Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Glu Trp Asn
 340 345 350
 Asn Phe Ser Phe Phe Pro Glu Ile Thr His Ile Val Ile Lys Glu Ser
 355 360 365
 Val Val Ser Ile Asn Lys Gln Asp Asn Lys Lys Met Glu Leu Lys Leu
 370 375 380
 Ser Ser His Glu Glu Ala Leu Ser Phe Val Ser Leu Val Asp Gly Tyr
 385 390 395 400
 Phe Arg Leu Thr Ala Asp Ala His His Tyr Leu Cys Thr Asp Val Ala
 405 410 415
 Pro Pro Leu Ile Val His Asn Ile Gln Asn Gly Cys His Gly Pro Ile
 420 425 430
 Cys Thr Glu Tyr Ala Ile Asn Lys Leu Arg Gln Glu Gly Ser Glu Glu
 435 440 445
 Gly Met Tyr Val Leu Arg Trp Ser Cys Thr Asp Phe Asp Asn Ile Leu

115

116

450 455 460
 Met Thr Val Thr Cys Phe Glu Lys Ser Glu Gln Val Gln Gly Ala Gln
 465 470 475 480
 Lys Gln Phe Lys Asn Phe Gln Ile Glu Val Gln Lys Gly Arg Tyr Ser
 485 490 495
 Leu His Gly Ser Asp Arg Ser Phe Pro Ser Leu Gly Asp Leu Met Ser
 500 505 510
 His Leu Lys Lys Gln Ile Leu Arg Thr Asp Asn Ile Ser Phe Met Leu
 515 520 525
 Lys Arg Cys Cys Gln Pro Lys Pro Arg Glu Ile Ser Asn Leu Leu Val
 530 535 540
 Ala Thr Lys Lys Ala Gln Glu Trp Gln Pro Val Tyr Pro Met Ser Gln
 545 550 555 560
 Leu Ser Phe Asp Arg Ile Leu Lys Lys Asp Leu Val Gln Gly Glu His
 565 570 575
 Leu Gly Arg Gly Thr Arg Thr His Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Met Asp
 580 585 590
 Tyr Lys Asp Asp Glu Gly Thr Ser Glu Glu Lys Lys Ile Lys Val Ile
 595 600 605
 Leu Lys Val Leu Asp Pro Ser His Arg Asp Ile Ser Leu Ala Phe Phe
 610 615 620
 Glu Ala Ala Ser Met Met Arg Gln Val Ser His Lys His Ile Val Tyr
 625 630 635 640
 Leu Tyr Gly Val Cys Val Arg Asp Val Glu Asn Ile Met Val Glu Glu
 645 650 655
 Phe Val Glu Gly Gly Pro Leu Asp Leu Phe Met His Arg Lys Ser Asp
 660 665 670
 Val Leu Thr Thr Pro Trp Lys Phe Lys Val Ala Lys Gln Leu Ala Ser
 675 680 685
 Ala Leu Ser Tyr Leu Glu Asp Lys Asp Leu Val His Gly Asn Val Cys
 690 695 700
 Thr Lys Asn Leu Leu Leu Ala Arg Glu Gly Ile Asp Ser Glu Cys Gly
 705 710 715 720
 Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Ile Pro Ile Thr Val Leu Ser
 725 730 735
 Arg Gln Glu Cys Ile Glu Arg Ile Pro Trp Ile Ala Pro Glu Cys Val
 740 745 750
 Glu Asp Ser Lys Asn Leu Ser Val Ala Ala Asp Lys Trp Ser Phe Gly
 755 760 765
 Thr Thr Leu Trp Glu Ile Cys Tyr Asn Gly Glu Ile Pro Leu Lys Asp
 770 775 780
 Lys Thr Leu Ile Glu Lys Glu Arg Phe Tyr Glu Ser Arg Cys Arg Pro
 785 790 795 800
 Val Thr Pro Ser Cys Lys Glu Leu Ala Asp Leu Met Thr Arg Cys Met
 805 810 815
 Asn Tyr Asp Pro Asn Gln Arg Pro Phe Phe Arg Ala Ile Met Arg Asp
 820 825 830
 Ile Asn Lys Leu Glu Glu Gln Asn Pro Asp Ile Val Ser Arg Lys Lys
 835 840 845
 Asn Gln Pro Thr Glu Val Asp Pro Thr His Phe Glu Lys Arg Phe Leu

117

118

850 855 860
 Lys Arg Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Glu Leu
 865 870 875 880
 Cys Arg Tyr Asp Pro Glu Asp Asn Thr Gly Glu Gln Val Ala Val Lys
 885 890 895 Ser Leu L
 ys Pro Glu Ser Gly Gly Asn His Ile Ala Asp Leu Lys Lys
 900 905 910
 Glu Ile Glu Ile Leu Arg Asn Leu Tyr His Glu Asn Ile Val Lys Tyr
 915 920 925
 Lys Gly Ile Cys Thr Glu Asp Gly Gly Asn Gly Ile Lys Leu Ile Met
 930 935 940
 Glu Phe Leu Pro Ser Gly Ser Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Lys Asn Lys
 945 950 955 960
 Asn Lys Ile Asn Leu Lys Gln Gln Leu Lys Tyr Ala Val Gln Ile Cys
 965 970 975
 Lys Gly Met Asp Tyr Leu Gly Ser Arg Gln Tyr Val His Arg Asp Leu
 980 985 990
 Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Glu Ser Glu His Gln Val Lys Ile Gly
 995 1000 1005
 Asp Phe Gly Leu Thr Lys Ala Ile Glu Thr Asp Lys Glu Tyr Tyr Thr
 1010 1015 1020
 Val Lys Asp Asp Arg Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu Cys
 1025 1030 1035 1040
 Leu Met Gln Ser Lys Phe Tyr Ile Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 1045 1050 1055
 Val Thr Leu His Glu Leu Leu Thr Tyr Cys Asp Ser Asp Ser Ser Pro
 1060 1065 1070
 Met Ala Leu Phe Leu Lys Met Ile Gly Pro Thr His Gly Gln Met Thr
 1075 1080 1085
 Val Thr Arg Leu Val Asn Thr Leu Lys Glu Gly Lys Arg Leu Pro Cys
 1090 1095 1100
 Pro Pro Asn Cys Pro Asp Glu Val Tyr Gln Leu Met Arg Lys Cys Trp
 1105 1110 1115 1120
 Glu Phe Gln Pro Ser Asn Arg Thr Ser Phe Gln Asn Leu Ile Glu Gly
 1125 1130 1135
 Phe Glu Ala Leu Leu Lys
 1140

【0204】配列番号12

配列の長さ：3561塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の特徴

40 特徴を表す記号：C D S

存在位置：1..3561

ATG CCT CTG CGC CAC TGG GGG ATG GCC AGG GGC AGT AAG CCC GTT GGG	48
Met Pro Leu Arg His Trp Gly Met Ala Arg Gly Ser Lys Pro Val Gly	
1 5 10 15	
GAT GGA GCC CAG CCC ATG GCT GCC ATG GGA GGC CTG AAG GTG CTT CTG	96
Asp Gly Ala Gln Pro Met Ala Ala Met Gly Gly Leu Lys Val Leu Leu	
20 25 30	
CAC TGG GCT GGT CCA GGC GGC GGG GAG CCC TGG GTC ACT TTC AGT GAG	144
His Trp Ala Gly Pro Gly Gly Gly Glu Pro Trp Val Thr Phe Ser Glu	
35 40 45	

119	120
TCA TCG CTG ACA GCT GAG GAA GTC TGC ATC CAC ATT GCA CAT AAA GTT	192
Ser Ser Leu Thr Ala Glu Glu Val Cys Ile His Ile Ala His Lys Val	
50 55 60	
GGT ATC ACT CCT CCT TGC TTC AAT CTC TTT GCC CTC TTC GAT GCT CAG	240
Gly Ile Thr Pro Pro Cys Phe Asn Leu Phe Ala Leu Phe Asp Ala Gln	
65 70 75 80	
GCC CAA GTC TGG TTG CCC CCA AAC CAC ATC CTA GAG ATC CCC AGA GAT	288
Ala Gln Val Trp Leu Pro Pro Asn His Ile Leu Glu Ile Pro Arg Asp	
85 90 95	
GCA AGC CTG ATG CTA TAT TTC CGC ATA AGG TTT TAT TTC CGG AAC TGG	336
Ala Ser Leu Met Leu Tyr Phe Arg Ile Arg Phe Tyr Phe Arg Asn Trp	
100 105 110	
CAT GGC ATG AAT CCT CGG GAA CCG GCT GTG TAC CGT TGT GGG CCC CCA	384
His Gly Met Asn Pro Arg Glu Pro Ala Val Tyr Arg Cys Gly Pro Pro	
115 120 125	
GGA ACC GAG GCA TCC TCA GAT CAG ACA GCA CAG GGG ATG CAA CTC CTG	432
Gly Thr Glu Ala Ser Ser Asp Gln Thr Ala Gln Gly Met Gln Leu Leu	
130 135 140	
GAC CCA GCC TCA TTT GAG TAC CTC TTT GAG CAG GGC AAG CAT GAG TTT	480
Asp Pro Ala Ser Phe Glu Tyr Leu Phe Glu Gln Gly Lys His Glu Phe	
145 150 155 160	
GTG AAT GAC GTG GCA TCA CTG TGG GAG CTG TCG ACC GAG GAG GAG ATC	528
Val Asn Asp Val Ala Ser Leu Trp Glu Leu Ser Thr Glu Glu Glu Ile	
165 170 175	
CAC CAC TTT AAG AAT GAG AGC CTG GGC ATG GCC TTT CTG CAC CTC TGT	576
His His Phe Lys Asn Glu Ser Leu Gly Met Ala Phe Leu His Leu Cys	
180 185 190	
CAC CTC GCT CTC CGC CAT GGC ATC CCC CTG GAG GAG GTG GCC AAG AAG	624
His Leu Ala Leu Arg His Gly Ile Pro Leu Glu Glu Val Ala Lys Lys	
195 200 205	
ACC AGC TTC AAG GAC TGC ATC CCG CGC TCC TTC CGC CGG CAT ATC CGG	672
Thr Ser Phe Lys Asp Cys Ile Pro Arg Ser Phe Arg Arg His Ile Arg	
210 215 220	
CAG CAC AGC GCC CTG ACC CGG CTG CGC CTT CGG AAC GTC TTC CGC AGG	720
Gln His Ser Ala Leu Thr Arg Leu Arg Leu Arg Asn Val Phe Arg Arg	
225 230 235 240	
TTC CTG CGG GAC TTC CAG CCG GGC CGA CTC TCC CAG CAG ATG GTC ATG	768
Phe Leu Arg Asp Phe Gln Pro Gly Arg Leu Ser Gln Gln Met Val Met	
245 250 255	
GTC AAA TAC CTA GCC ACA CTC GAG CGG CTG GCA CCC CGC TTC GGC ACA	816
Val Lys Tyr Leu Ala Thr Leu Glu Arg Leu Ala Pro Arg Phe Gly Thr	
260 265 270	
GAG CGT GTG CCC GTG TGC CAC CTG AGG CTG CTG GCC CAG GCC GAG GGG	864
Glu Arg Val Pro Val Cys His Leu Arg Leu Leu Ala Gln Ala Glu Gly	
275 280 285	
GAG CCC TGC TAC ATC CGG GAC AGT GGG GTG GCC CCT ACA GAC CCT GGC	912
Glu Pro Cys Tyr Ile Arg Asp Ser Gly Val Ala Pro Thr Asp Pro Gly	
290 295 300	
CCT GAG TCT GCT GCT GGG CCC CCA ACC CAC GAG GTG CTG GTG ACA GGC	960
Pro Glu Ser Ala Ala Gly Pro Pro Thr His Glu Val Leu Val Thr Gly	

121	122
305	320
ACT GGT GGC ATC CAG TGG TGG CCA GTA CAG GAG GAG GTG AAC AAG GAG	1008
Thr Gly Gly Ile Gln Trp Trp Pro Val Glu Glu Glu Val Asn Lys Glu	
325	330
GAG GGT TCT AGT GGC AGC AGT GGC AGG AAC CCC CAA GCC AGC CTG TTT	1056
Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Arg Asn Pro Gln Ala Ser Leu Phe	
340	345
GGG AAG AAG GCC AAG GCT CAC AAG GCA TTC GGC CAG CCG GCA GAC AGG	1104
Gly Lys Lys Ala Lys Ala His Lys Ala Phe Gly Gln Pro Ala Asp Arg	
355	360
CCG CGG GAG CCA CTG TGG GCC TAC TTC TGT GAC TTC CGG GAC ATC ACC	1152
Pro Arg Glu Pro Leu Trp Ala Tyr Phe Cys Asp Phe Arg Asp Ile Thr	
370	375
CAC GTG GTG CTG AAA GAG CAC TGT GTC AGC ATC CAC CGG CAG GAC AAC	1200
His Val Val Leu Lys Glu His Cys Val Ser Ile His Arg Gln Asp Asn	
385	390
AAG TGC CTG GAG CTG AGC TTG CCT TCC CGG GCT GCG GCG CTG TCC TTC	1248
Lys Cys Leu Glu Leu Ser Leu Pro Ser Arg Ala Ala Ala Leu Ser Phe	
405	410
GTG TCG CTG GTG GAC GGC TAT TTC CGG CTG ACG GCC GAC TCC AGC CAC	1296
Val Ser Leu Val Asp Gly Tyr Phe Arg Leu Thr Ala Asp Ser Ser His	
420	425
TAC CTG TGC CAC GAG GTG GCT CCC CCA CGG CTG GTG ATG AGC ATC CGG	1344
Tyr Leu Cys His Glu Val Ala Pro Pro Arg Leu Val Met Ser Ile Arg	
435	440
GAT GGG ATC CAC GGA CCC CTG CTG GAG CCA TTT GTG CAG GCC AAG CTG	1392
Asp Gly Ile His Gly Pro Leu Leu Glu Pro Phe Val Gln Ala Lys Leu	
450	455
CGG CCC GAG GAC GGC CTG TAC CTC ATT CAC TGG AGC ACC AGC CAC CCC	1440
Arg Pro Glu Asp Gly Leu Tyr Leu Ile His Trp Ser Thr Ser His Pro	
465	470
TAC CGC CTG ATC CTC ACA GTG GCC CAG CGT AGC CAG GCA CCA GAC GGC	1488
Tyr Arg Leu Ile Leu Thr Val Ala Gln Arg Ser Gln Ala Pro Asp Gly	
485	490
ATG CAG AGC TTG CGG CTC CGA AAG TTC CCC ATT GAG CAG CAG GAC GGG	1536
Met Gln Ser Leu Arg Leu Arg Lys Phe Pro Ile Glu Gln Gln Asp Gly	
500	505
GCC TTC GTG CTG GAG GGC TGG GGC CGG TCC TTC CCC AGC GTT CGG GAA	1584
Ala Phe Val Leu Glu Gly Trp Gly Arg Ser Phe Pro Ser Val Arg Glu	
515	520
CTT GGG GCT GCC TTG CAG GGC TGC TTG CTG AGG GCC GGG GAT GAC TGC	1632
Leu Gly Ala Ala Leu Gln Gly Cys Leu Leu Arg Ala Gly Asp Asp Cys	
530	535
TTC TCT CTG CGT CGC TGT TGC CTG CCC CAA CCA GGA GAA ACC TCC AAT	1680
Phe Ser Leu Arg Arg Cys Cys Leu Pro Gln Pro Gly Glu Thr Ser Asn	
545	550
CTC ATC ATC ATG CGG GGG GCT CGG GCC AGC CCC AGG ACA CTC AAC CTC	1728
Leu Ile Ile Met Arg Gly Ala Arg Ala Ser Pro Arg Thr Leu Asn Leu	
565	570
AGC CAG CTC AGC TTC CAC CGG GTT GAC CAG AAG GAG ATC ACC CAG CTG	1776

123	124
Ser Gln Leu Ser Phe His Arg Val Asp Gln Lys Glu Ile Thr Gln Leu	
580 585 590	
TCC CAC TTG GGC CAG GGC ACA AGG ACC AAC GTG TAT GAG GGC CGC CTG	1824
Ser His Leu Gly Gln Gly Thr Arg Thr Asn Val Tyr Glu Gly Arg Leu	
595 600 605	
CGA GTG GAG GGC AGC GGC GAC CCT GAG GAG GGC AAG ATG GAT GAC GAG	1872
Arg Val Glu Gly Ser Gly Asp Pro Glu Glu Gly Lys Met Asp Asp Glu	
610 615 620	
GAC CCC CTC GTG CCT GGC AGG GAC CGT GGC CAG GAG CTA CGA GTG GTG	1920
Asp Pro Leu Val Pro Gly Arg Asp Arg Gly Gln Glu Leu Arg Val Val	
625 630 635 640	
CTC AAA GTG CTG GAC CCT AGT CAC CAT GAC ATC GCC CTG GCC TTC TAC	1968
Leu Lys Val Leu Asp Pro Ser His His Asp Ile Ala Leu Ala Phe Tyr	
645 650 655	
GAG ACA GCC AGC CTC ATG AGC CAG GTC TCC CAC ACG CAC CTG GCC TTC	2016
Glu Thr Ala Ser Leu Met Ser Gln Val Ser His Thr His Leu Ala Phe	
660 665 670	
GTG CAT GGC GTC TGT GTG CGC GGC CCT GAA AAT AGC ATG GTG ACA GAG	2064
Val His Gly Val Cys Val Arg Gly Pro Glu Asn Ser Met Val Thr Glu	
675 680 685	
TAC GTG GAG CAC GGA CCC CTG GAT GTG TGG CTG CGG AGG GAG CGG GGC	2112
Tyr Val Glu His Gly Pro Leu Asp Val Trp Leu Arg Arg Glu Arg Gly	
690 695 700	
CAT GTG CCC ATG GCT TGG AAG ATG GTG GTG GCC CAG CAG CTG GCC AGC	2160
His Val Pro Met Ala Trp Lys Met Val Val Ala Gln Gln Leu Ala Ser	
705 710 715 720	
GCC CTC AGC TAC CTG GAG AAC AAG AAC CTG GTT CAT GGT AAT GTG TGT	2208
Ala Leu Ser Tyr Leu Glu Asn Lys Asn Leu Val His Gly Asn Val Cys	
725 730 735	
GGC CGG AAC ATC CTG CTG GCC CGG CTG GGC TTG GCA GAG GGC ACC AGC	2256
Gly Arg Asn Ile Leu Leu Ala Arg Leu Gly Leu Ala Glu Gly Thr Ser	
740 745 750	
CCC TTC ATC AAG CTG AGT GAT CCT GGC GTG GGC CTG GGC GCC CTC TCC	2304
Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Val Gly Leu Gly Ala Leu Ser	
755 760 765	
AGG GAG GAG CGG GTG GAG AGG ATC CCC TGG CTG GCC CCC GAA TGC CTA	2352
Arg Glu Glu Arg Val Glu Arg Ile Pro Trp Leu Ala Pro Glu Cys Leu	
770 775 780	
CCA GGT GGC GCC AAC AGC CTA AGC ACC GCC ATG GAC AAG TGG GGC TTT	2400
Pro Gly Gly Ala Asn Ser Leu Ser Thr Ala Met Asp Lys Trp Gly Phe	
785 790 795 800	
GGC GCC ACC CTC CTG GAG ATC TGC TTT GAC GGA GAG GCC CCT CTG CAG	2448
Gly Ala Thr Leu Leu Glu Ile Cys Phe Asp Gly Glu Ala Pro Leu Gln	
805 810 815	
AGC CGC AGT CCC TCC GAG AAG GAG CAT TTC TAC CAG AGG CAG CAC CGG	2496
Ser Arg Ser Pro Ser Glu Lys Glu His Phe Tyr Gln Arg Gln His Arg	
820 825 830	
CTG CCC GAG CCC TCC TGC CCA CAG CTG GCC ACA CTC ACC AGC CAG TGT	2544
Leu Pro Glu Pro Ser Cys Pro Gln Leu Ala Thr Leu Thr Ser Gln Cys	
835 840 845	

125	126
CTG ACC TAT GAG CCA ACC CAG AGG CCA TCA TTC CGC ACC ATC CTG CGT Leu Thr Tyr Glu Pro Thr Gln Arg Pro Ser Phe Arg Thr Ile Leu Arg 850 855 860	2592
GAC CTC ACC CGC GTG CAG CCC CAC AAT CTT GCT GAC GTC TTG ACT GTG Asp Leu Thr Arg Val Gln Pro His Asn Leu Ala Asp Val Leu Thr Val 865 870 875 880	2640
AAC CGG GAC TCA CCG GCC GTC GGA CCT ACT ACT TTC CAC AAG CGC TAT Asn Arg Asp Ser Pro Ala Val Gly Pro Thr Thr Phe His Lys Arg Tyr 885 890 895	2688
TTG AAA AAG ATC CGA GAT CTG GGC GAG GGT CAC TTC GGC AAG GTC AGC Leu Lys Lys Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Ser 900 905 910	2736
TTG TAC TGC TAC GAT CCG ACC AAC GAC GGC ACT GGC GAG ATG GTG GCG Leu Tyr Cys Tyr Asp Pro Thr Asn Asp Gly Thr Gly Glu Met Val Ala 915 920 925	2784
GTG AAA GCC CTC AAG GCA GAC TGC GGC CCC CAG CAC CGC TCG GGC TGG Val Lys Ala Leu Lys Ala Asp Cys Gly Pro Gln His Arg Ser Gly Trp 930 935 940	2832
AAG CAG GAG ATT GAC ATT CTG CGC ACG CTC TAC CAC GAG CAC ATC ATC Lys Gln Glu Ile Asp Ile Leu Arg Thr Leu Tyr His Glu His Ile Ile 945 950 955 960	2880
AAG TAC AAG GGC TGC TGC GAG GAC CAA GGC GAG AAG TCG CTG CAG CTG Lys Tyr Lys Gly Cys Cys Glu Asp Gln Gly Glu Lys Ser Leu Gln Leu 965 970 975	2928
GTC ATG GAG TAC GTG CCC CTG GGC AGC CTC CGA GAC TAC CTG CCC CGG Val Met Glu Tyr Val Pro Leu Gly Ser Leu Arg Asp Tyr Leu Pro Arg 980 985 990	2976
CAC AGC ATC GGG CTG GCC CAG CTG CTG CTC TTC GCC CAG CAG ATC TGC His Ser Ile Gly Leu Ala Gln Leu Leu Leu Phe Ala Gln Gln Ile Cys 995 1000 1005	3024
GAG GGC ATG GCC TAT CTG CAC GCG CAC GAC TAC ATC CAC CGA GAC CTA Glu Gly Met Ala Tyr Leu His Ala His Asp Tyr Ile His Arg Asp Leu 1010 1015 1020	3072
GCC GCG CGC AAC GTG CTG CTG GAC AAC GAC AGG CTG GTC AAG ATC GGG Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Asp Asn Asp Arg Leu Val Lys Ile Gly 1025 1030 1035 1040	3120
GAC TTT GGC CTA GCC AAG GCC GTG CCC GAA GGC CAC GAG TAC TAC CGC Asp Phe Gly Leu Ala Lys Ala Val Pro Glu Gly His Glu Tyr Tyr Arg 1045 1050 1055	3168
GTG CGC GAG GAT GGG GAC AGC CCC GTG TTC TGG TAT GCC CCA GAG TGC Val Arg Glu Asp Gly Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu Cys 1060 1065 1070	3216
CTG AAG GAG TAT AAG TTC TAC TAT GCG TCA GAT GTC TGG TCC TTC GGG Leu Lys Glu Tyr Lys Phe Tyr Tyr Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly 1075 1080 1085	3264
GTG ACC CTG TAT GAG CTG CTG ACG CAC TGT GAC TCC AGC CAG AGC CCC Val Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Thr His Cys Asp Ser Ser Gln Ser Pro 1090 1095 1100	3312
CCC ACG AAA TTC CTT GAG CTC ATA GGC ATT GCT CAG GGT CAG ATG ACA Pro Thr Lys Phe Leu Glu Leu Ile Gly Ile Ala Gln Gly Gln Met Thr	3360

127		128
1105	1110	1115
GTT CTG AGA CTC ACT GAG TTG CTG GAA CGA GGG GAG AGG CTG CCA CGG		3408
Val Leu Arg Leu Thr Glu Leu Leu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Pro Arg		
1125	1130	1135
CCC GAC AAA TGT CCC TGT GAG GTC TAT CAT CTC ATG AAG AAC TGC TGG		3456
Pro Asp Lys Cys Pro Cys Glu Val Tyr His Leu Met Lys Asn Cys Trp		
1140	1145	1150
GAG ACA GAG GCG TCC TTT CGC CCA ACC TTC GAG AAC CTC ATA CCC ATT		3504
Glu Thr Glu Ala Ser Phe Arg Pro Thr Phe Glu Asn Leu Ile Pro Ile		
1155	1160	1165
CTG AAG ACA GTC CAT GAG AAG TAC CAA GGC CAG GCC CCT TCA GTG TTC		3552
Leu Lys Thr Val His Glu Lys Tyr Gln Gly Gln Ala Pro Ser Val Phe		
1170	1175	1180
AGC GTG TGC		3561
Ser Val Cys		
1185		

【0205】配列番号13

配列の長さ: 1187

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: プロテイン

配列

Met Pro Leu Arg His Trp Gly Met Ala Arg Gly Ser Lys Pro Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Gly Ala Gln Pro Met Ala Ala Met Gly Gly Leu Lys Val Leu Leu
 20 25 30
 His Trp Ala Gly Pro Gly Gly Gly Glu Pro Trp Val Thr Phe Ser Glu
 35 40 45
 Ser Ser Leu Thr Ala Glu Glu Val Cys Ile His Ile Ala His Lys Val
 50 55 60
 Gly Ile Thr Pro Pro Cys Phe Asn Leu Phe Ala Leu Phe Asp Ala Gln
 65 70 75 80
 Ala Gln Val Trp Leu Pro Pro Asn His Ile Leu Glu Ile Pro Arg Asp
 85 90 95
 Ala Ser Leu Met Leu Tyr Phe Arg Ile Arg Phe Tyr Phe Arg Asn Trp
 100 105 110
 His Gly Met Asn Pro Arg Glu Pro Ala Val Tyr Arg Cys Gly Pro Pro
 115 120 125
 Gly Thr Glu Ala Ser Ser Asp Gln Thr Ala Gln Gly Met Gln Leu Leu
 130 135 140
 Asp Pro Ala Ser Phe Glu Tyr Leu Phe Glu Gln Gly Lys His Glu Phe
 145 150 155 160
 Val Asn Asp Val Ala Ser Leu Trp Glu Leu Ser Thr Glu Glu Glu Ile
 165 170 175
 His His Phe Lys Asn Glu Ser Leu Gly Met Ala Phe Leu His Leu Cys
 180 185 190
 His Leu Ala Leu Arg His Gly Ile Pro Leu Glu Glu Val Ala Lys Lys
 195 200 205
 Thr Ser Phe Lys Asp Cys Ile Pro Arg Ser Phe Arg Arg His Ile Arg
 210 215 220
 Gln His Ser Ala Leu Thr Arg Leu Arg Leu Arg Asn Val Phe Arg Arg
 225 230 235 240

129

130

Phe Leu Arg Asp Phe Gln Pro Gly Arg Leu Ser Gln Gln Met Val Met
 245 250 255
 Val Lys Tyr Leu Ala Thr Leu Glu Arg Leu Ala Pro Arg Phe Gly Thr
 260 265 270
 Glu Arg Val Pro Val Cys His Leu Arg Leu Leu Ala Gln Ala Glu Gly
 275 280 285
 Glu Pro Cys Tyr Ile Arg Asp Ser Gly Val Ala Pro Thr Asp Pro Gly
 290 295 300
 Pro Glu Ser Ala Ala Gly Pro Pro Thr His Glu Val Leu Val Thr Gly
 305 310 315 320
 Thr Gly Gly Ile Gln Trp Trp Pro Val Glu Glu Glu Val Asn Lys Glu
 325 330 335
 Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Arg Asn Pro Gln Ala Ser Leu Phe
 340 345 350
 Gly Lys Lys Ala Lys Ala His Lys Ala Phe Gly Gln Pro Ala Asp Arg
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Leu Trp Ala Tyr Phe Cys Asp Phe Arg Asp Ile Thr
 370 375 380
 His Val Val Leu Lys Glu His Cys Val Ser Ile His Arg Gln Asp Asn
 385 390 395 400
 Lys Cys Leu Glu Leu Ser Leu Pro Ser Arg Ala Ala Ala Leu Ser Phe
 405 410 415
 Val Ser Leu Val Asp Gly Tyr Phe Arg Leu Thr Ala Asp Ser Ser His
 420 425 430
 Tyr Leu Cys His Glu Val Ala Pro Pro Arg Leu Val Met Ser Ile Arg
 435 440 445
 Asp Gly Ile His Gly Pro Leu Leu Glu Pro Phe Val Gln Ala Lys Leu
 450 455 460
 Arg Pro Glu Asp Gly Leu Tyr Leu Ile His Trp Ser Thr Ser His Pro
 465 470 475 480
 Tyr Arg Leu Ile Leu Thr Val Ala Gln Arg Ser Gln Ala Pro Asp Gly
 485 490 495
 Met Gln Ser Leu Arg Leu Arg Lys Phe Pro Ile Glu Gln Gln Asp Gly
 500 505 510
 Ala Phe Val Leu Glu Gly Trp Gly Arg Ser Phe Pro Ser Val Arg Glu
 515 520 525
 Leu Gly Ala Ala Leu Gln Gly Cys Leu Leu Arg Ala Gly Asp Asp Cys
 530 535 540
 Phe Ser Leu Arg Arg Cys Cys Leu Pro Gln Pro Gly Glu Thr Ser Asn
 545 550 555 560
 Leu Ile Ile Met Arg Gly Ala Arg Ala Ser Pro Arg Thr Leu Asn Leu
 565 570 575
 Ser Gln Leu Ser Phe His Arg Val Asp Gln Lys Glu Ile Thr Gln Leu
 580 585 590
 Ser His Leu Gly Gln Gly Thr Arg Thr Asn Val Tyr Glu Gly Arg Leu
 595 600 605
 Arg Val Glu Gly Ser Gly Asp Pro Glu Glu Gly Lys Met Asp Asp Glu
 610 615 620
 Asp Pro Leu Val Pro Gly Arg Asp Arg Gly Gln Glu Leu Arg Val Val
 625 630 635 640

Leu Lys Val Leu Asp Pro Ser His His Asp Ile Ala Leu Ala Phe Tyr
 645 650 655
 Glu Thr Ala Ser Leu Met Ser Gln Val Ser His Thr His Leu Ala Phe
 660 665 670
 Val His Gly Val Cys Val Arg Gly Pro Glu Asn Ser Met Val Thr Glu
 675 680 685
 Tyr Val Glu His Gly Pro Leu Asp Val Trp Leu Arg Arg Glu Arg Gly
 690 695 700
 His Val Pro Met Ala Trp Lys Met Val Val Ala Gln Gln Leu Ala Ser
 705 710 715 720
 Ala Leu Ser Tyr Leu Glu Asn Lys Asn Leu Val His Gly Asn Val Cys
 725 730 735
 Gly Arg Asn Ile Leu Leu Ala Arg Leu Gly Leu Ala Glu Gly Thr Ser
 740 745 750
 Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Val Gly Leu Gly Ala Leu Ser
 755 760 765
 Arg Glu Glu Arg Val Glu Arg Ile Pro Trp Leu Ala Pro Glu Cys Leu
 770 775 780
 Pro Gly Gly Ala Asn Ser Leu Ser Thr Ala Met Asp Lys Trp Gly Phe
 785 790 795 800
 Gly Ala Thr Leu Leu Glu Ile Cys Phe Asp Gly Glu Ala Pro Leu Gln
 805 810 815
 Ser Arg Ser Pro Ser Glu Lys Glu His Phe Tyr Gln Arg Gln His Arg
 820 825 830
 Leu Pro Glu Pro Ser Cys Pro Gln Leu Ala Thr Leu Thr Ser Gln Cys
 835 840 845
 Leu Thr Tyr Glu Pro Thr Gln Arg Pro Ser Phe Arg Thr Ile Leu Arg
 850 855 860
 Asp Leu Thr Arg Val Gln Pro His Asn Leu Ala Asp Val Leu Thr Val
 865 870 875 880
 Asn Arg Asp Ser Pro Ala Val Gly Pro Thr Thr Phe His Lys Arg Tyr
 885 890 895
 Leu Lys Lys Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Ser
 900 905 910
 Leu Tyr Cys Tyr Asp Pro Thr Asn Asp Gly Thr Gly Glu Met Val Ala
 915 920 925
 Val Lys Ala Leu Lys Ala Asp Cys Gly Pro Gln His Arg Ser Gly Trp
 930 935 940
 Lys Gln Glu Ile Asp Ile Leu Arg Thr Leu Tyr His Glu His Ile Ile
 945 950 955 960
 Lys Tyr Lys Gly Cys Cys Glu Asp Gln Gly Glu Lys Ser Leu Gln Leu
 965 970 975
 Val Met Glu Tyr Val Pro Leu Gly Ser Leu Arg Asp Tyr Leu Pro Arg
 980 985 990
 His Ser Ile Gly Leu Ala Gln Leu Leu Leu Phe Ala Gln Gln Ile Cys
 995 1000 1005
 Glu Gly Met Ala Tyr Leu His Ala His Asp Tyr Ile His Arg Asp Leu
 1010 1015 1020
 Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Asp Asn Asp Arg Leu Val Lys Ile Gly
 1025 1030 1035 1040

133

134

Asp Phe Gly Leu Ala Lys Ala Val Pro Glu Gly His Glu Tyr Tyr Arg
 1045 1050 1055
 Val Arg Glu Asp Gly Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu Cys
 1060 1065 1070
 Leu Lys Glu Tyr Lys Phe Tyr Tyr Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 1075 1080 1085
 Val Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Thr His Cys Asp Ser Ser Gln Ser Pro
 1090 1095 1100
 Pro Thr Lys Phe Leu Glu Leu Ile Gly Ile Ala Gln Gly Gln Met Thr
 1105 1110 1115 1120
 Val Leu Arg Leu Thr Glu Leu Leu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Pro Arg
 1125 1130 1135
 Pro Asp Lys Cys Pro Cys Glu Val Tyr His Leu Met Lys Asn Cys Trp
 1140 1145 1150
 Glu Thr Glu Ala Ser Phe Arg Pro Thr Phe Glu Asn Leu Ile Pro Ile
 1155 1160 1165
 Leu Lys Thr Val His Glu Lys Tyr Gln Gly Gln Ala Pro Ser Val Phe
 1170 1175 1180
 Ser Val Cys
 1185

【0206】配列番号14

配列の長さ: 1154

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: プロテイン

配列

Met	Gln	Tyr	Leu	Asn	Ile	Lys	Glu	Asp	
Cys	Asn	Ala	Met	Ala	Phe	Cys			
1				5					
10					15				
Ala	Lys	Met	Arg	Ser	Ser	Lys	Lys	Thr	
Glu	Val	Asn	Leu	Glu	Ala	Pro			
			20						25
				30					
Glu	Pro	Gly	Val	Glu	Val	Ile	Phe	Tyr	
Leu	Ser	Asp	Arg	Glu	Pro	Leu			
			35						40
				45					
Arg	Leu	Gly	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ala	
Glu	Glu	Leu	Cys	Ile	Arg	Ala			
			50						55
				60					
Ala	Gln	Ala	Cys	Arg	Ile	Ser	Pro	Leu	
Cys	His	Asn	Leu	Phe	Ala	Leu			
			65						70
				75					80
Tyr	Asp	Glu	Asn	Thr	Lys	Leu	Trp	Tyr	
Ala	Pro	Asn	Arg	Thr	Ile	Thr			
				85					
				90					95
Val	Asp	Asp	Lys	Met	Ser	Leu	Arg	Leu	
His	Tyr	Arg	Met	Arg	Phe	Tyr			

135					136				
100					105				
110									
Phe	Thr	Asn	Trp	His	Gly	Thr	Asn	Asp	
Asn	Glu	Gln	Ser	Val	Trp	Arg			
115					120				
125									
His	Ser	Pro	Lys	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	
Tyr	Glu	Lys	Lys	Lys	Ile	Pro			
130					135				
140									
Asp	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Ala	Ser	
Ser	Leu	Glu	Tyr	Leu	Phe	Ala			
145					150				
155					160				
Gln	Gly	Gln	Tyr	Asp	Leu	Val	Lys	Cys	
Leu	Ala	Pro	Ile	Arg	Asp	Pro			
165									
170					175				
Lys	Thr	Glu	Gln	Asp	Gly	His	Asp	Ile	
Glu	Asn	Glu	Cys	Leu	Gly	Met			
180					185				
190									
Ala	Val	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Tyr	Ala	
Met	Met	Lys	Lys	Met	Gln	Leu			
195					200				
205									
Pro	Glu	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Ser	Tyr	
Lys	Arg	Tyr	Ile	Pro	Glu	Thr			
210					215				
220									
Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Arg	Gln	Arg	Asn	
Leu	Leu	Thr	Arg	Met	Arg	Ile			
225					230				
235					240				
Asn	Asn	Val	Phe	Lys	Asp	Phe	Leu	Lys	
Glu	Phe	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile			
245									
250					255				
Cys	Asp	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	His	Asp	
Leu	Lys	Val	Lys	Tyr	Leu	Ala			
260					265				
270									
Thr	Leu	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	His	Tyr	
Gly	Ala	Glu	Ile	Phe	Glu	Thr			
275					280				
285									
Ser	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Ser	Glu	Asn	
Glu	Met	Asn	Trp	Phe	His	Ser			
290					295				
300									

137					138				
Asn	Asp	Gly	Gly	Asn	Val	Leu	Tyr	Tyr	
Glu	Val	Met	Val	Thr	Gly	Asn			
305					310				
	315					320			
Leu	Gly	Ile	Gln	Trp	Arg	His	Lys	Pro	
Asn	Val	Val	Ser	Val	Glu	Lys			
				325					
330					335				
Glu	Lys	Asn	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Lys	
Leu	Glu	Asn	Lys	Asp	Lys	Lys			
			340					345	
				350					
Asp	Glu	Glu	Lys	Asn	Lys	Ile	Arg	Glu	
Glu	Trp	Asn	Asn	Phe	Ser	Phe			
		355					360		
			365						
Phe	Pro	Glu	Ile	Thr	His	Ile	Val	Ile	
Lys	Glu	Ser	Val	Val	Ser	Ile			
	370					375			
		380							
Asn	Lys	Gln	Asp	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	His	Glu			
385					390				
	395					400			
Glu	Ala	Leu	Ser	Phe	Val	Ser	Leu	Val	
Asp	Gly	Tyr	Phe	Arg	Leu	Thr			
				405					
410					415				
Ala	Asp	Ala	His	His	Tyr	Leu	Cys	Thr	
Asp	Val	Ala	Pro	Pro	Leu	Ile			
			420					425	
				430					
Val	His	Asn	Ile	Gln	Asn	Gly	Cys	His	
Gly	Pro	Ile	Cys	Thr	Glu	Tyr			
		435					440		
			445						
Ala	Ile	Asn	Lys	Leu	Arg	Gln	Glu	Gly	
Ser	Glu	Glu	Gly	Met	Tyr	Val			
	450					455			
		460							
Leu	Arg	Trp	Ser	Cys	Thr	Asp	Phe	Asp	
Asn	Ile	Leu	Met	Thr	Val	Thr			
465					470				
	475					480			
Cys	Phe	Glu	Lys	Ser	Glu	Gln	Val	Gln	
Gly	Ala	Gln	Lys	Gln	Phe	Lys			
				485					
490					495				
Asn	Phe	Gln	Ile	Glu	Val	Gln	Lys	Gly	
Arg	Tyr	Ser	Leu	His	Gly	Ser			

139					140				
500					505				
510									
Asp	Arg	Ser	Phe	Pro	Ser	Leu	Gly	Asp	
Leu	Met	Ser	His	Leu	Lys	Lys			
515					520				
525									
Gln	Ile	Leu	Arg	Thr	Asp	Asn	Ile	Ser	
Phe	Met	Leu	Lys	Arg	Cys	Cys			
530					535				
540									
Gln	Pro	Lys	Pro	Arg	Glu	Ile	Ser	Asn	
Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Lys	Lys			
545					550				
555					560				
Ala	Gln	Glu	Trp	Gln	Pro	Val	Tyr	Pro	
Met	Ser	Gln	Leu	Ser	Phe	Asp			
565									
570					575				
Arg	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Leu	Val	Gln	
Gly	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Gly			
580					585				
590									
Thr	Arg	Thr	His	Ile	Tyr	Ser	Gly	Thr	
Leu	Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp			
595					600				
605									
Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	Glu	Lys	Lys	Ile	
Lys	Val	Ile	Leu	Lys	Val	Leu			
610					615				
620									
Asp	Pro	Ser	His	Arg	Asp	Ile	Ser	Leu	
Ala	Phe	Phe	Glu	Ala	Ala	Ser			
625					630				
635					640				
Met	Met	Arg	Gln	Val	Ser	His	Lys	His	
Ile	Val	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Val			
645									
650					655				
Cys	Val	Arg	Asp	Val	Glu	Asn	Ile	Met	
Val	Glu	Glu	Phe	Val	Glu	Gly			
660					665				
670									
Gly	Pro	Leu	Asp	Leu	Phe	Met	His	Arg	
Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Thr	Thr			
675					680				
685									
Pro	Trp	Lys	Phe	Lys	Val	Ala	Lys	Gln	
Leu	Ala	Ser	Ala	Leu	Ser	Tyr			
690					695				
700									

141					142				
Leu	Glu	Asp	Lys	Asp	Leu	Val	His	Gly	
Asn	Val	Cys	Thr	Lys	Asn	Leu			
705					710				
	715					720			
Leu	Leu	Ala	Arg	Glu	Gly	Ile	Asp	Ser	
Glu	Cys	Gly	Pro	Phe	Ile	Lys			
				725					
730					735				
Leu	Ser	Asp	Pro	Gly	Ile	Pro	Ile	Thr	
Val	Leu	Ser	Arg	Gln	Glu	Cys			
			740					745	
				750					
Ile	Glu	Arg	Ile	Pro	Trp	Ile	Ala	Pro	
Glu	Cys	Val	Glu	Asp	Ser	Lys			
		755					760		
			765						
Asn	Leu	Ser	Val	Ala	Ala	Asp	Lys	Trp	
Ser	Phe	Gly	Thr	Thr	Leu	Trp			
	770					775			
		780							
Glu	Ile	Cys	Tyr	Asn	Gly	Glu	Ile	Pro	
Leu	Lys	Asp	Lys	Thr	Leu	Ile			
785					790				
	795					800			
Glu	Lys	Glu	Arg	Phe	Tyr	Glu	Ser	Arg	
Cys	Arg	Pro	Val	Thr	Pro	Ser			
				805					
810					815				
Cys	Lys	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu	Met	Thr	
Arg	Cys	Met	Asn	Tyr	Asp	Pro			
			820					825	
				830					
Asn	Gln	Arg	Pro	Phe	Phe	Arg	Ala	Ile	
Met	Arg	Asp	Ile	Asn	Lys	Leu			
		835					840		
			845						
Glu	Glu	Gln	Asn	Pro	Asp	Ile	Val	Ser	
Arg	Lys	Lys	Asn	Gln	Pro	Thr			
	850					855			
		860							
Glu	Val	Asp	Pro	Thr	His	Phe	Glu	Lys	
Arg	Phe	Leu	Lys	Arg	Ile	Arg			
865					870				
	875					880			
Asp	Leu	Gly	Glu	Gly	His	Phe	Gly	Lys	
Val	Glu	Leu	Cys	Arg	Tyr	Asp			
				885					
890					895				
Pro	Glu	Asp	Asn	Thr	Gly	Glu	Gln	Val	
Ala	Val	Lys	Ser	Leu	Lys	Pro			

143					144				
900					905				
910									
Glu	Ser	Gly	Gly	Asn	His	Ile	Ala	Asp	
Leu	Lys	Lys	Glu	Ile	Glu	Ile			
915					920				
925									
Leu	Arg	Asn	Leu	Tyr	His	Glu	Asn	Ile	
Val	Lys	Tyr	Lys	Gly	Ile	Cys			
930					935				
940									
Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Asn	Gly	Ile	Lys	
Leu	Ile	Met	Glu	Phe	Leu	Pro			
945					950				
955					960				
Ser	Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Tyr	Leu	Pro	
Lys	Asn	Lys	Asn	Lys	Ile	Asn			
965									
970					975				
Leu	Lys	Gln	Gln	Leu	Lys	Tyr	Ala	Val	
Gln	Ile	Cys	Lys	Gly	Met	Asp			
980					985				
990									
Tyr	Leu	Gly	Ser	Arg	Gln	Tyr	Val	His	
Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn			
995					1000				
1005									
Val	Leu	Val	Glu	Ser	Glu	His	Gln	Val	
Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Leu			
1010					1015				
1020									
Thr	Lys	Ala	Ile	Glu	Thr	Asp	Lys	Glu	
Tyr	Tyr	Thr	Val	Lys	Asp	Asp			
1025					1030				
1035					1040				
Arg	Asp	Ser	Pro	Val	Phe	Trp	Tyr	Ala	
Pro	Glu	Cys	Leu	Met	Gln	Ser			
1045									
1050					1055				
Lys	Phe	Tyr	Ile	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	
Ser	Phe	Gly	Val	Thr	Leu	His			
1060					1065				
1070									
Glu	Leu	Leu	Thr	Tyr	Cys	Asp	Ser	Asp	
Ser	Ser	Pro	Met	Ala	Leu	Phe			
1075					1080				
1085									
Leu	Lys	Met	Ile	Gly	Pro	Thr	His	Gly	
Gln	Met	Thr	Val	Thr	Arg	Leu			
1090					1095				
1100									

145

146

```

Val Asn Thr Leu Lys Glu Gly Lys Arg
Leu Pro Cys Pro Pro Asn Cys
1105 1110
1115 1120
Pro Asp Glu Val Tyr Gln Leu Met Arg
Lys Cys Trp Glu Phe Gln Pro
1125
1130 1135
Ser Asn Arg Thr Ser Phe Gln Asn Leu
Ile Glu Gly Phe Glu Ala Leu
1140 1145
1150
Leu Lys

```

【図面の簡単な説明】

【図1】マウスJak2のcDNA配列（塩基番号1-1173）およびそれがコードする推定のアミノ酸配列の模式図。Jak2読み取り枠とフランキング非コード領域のヌクレオチド配列と対応する1文字アミノ酸配列を示している。公開された部分的Jak2cDNA配列（ハーパー, A. G., ら, Oncogene 7:1347-1353 (1992)）からのヌクレオチドとアミノ酸配列情報を上部に示し、下部にはその情報が異なっている配列を示す。ATGコドンは*で示す。ヌクレオチド522の上部のアロー印(>)は報告されているJak2配列の5'末端を示す。ヌクレオチド位置226にあるアロー印(Λ)は先の研究で発見された7アミノ酸挿入の位置を示す（ハーパー, A. G., ら, Oncogene 7:1347-1353 (1992)）。

【図2】図1と同様、マウスJak2のcDNA配列（塩基番号1174-2373）およびそれがコードする推定のアミノ酸配列の模式図。

【図3】図1、2と同様、マウスJak2のcDNA配列（塩基番号2374-3629）およびそれがコードする推定のアミノ酸配列の模式図。

【図4】ヒトJak1キナーゼの公開されたアミノ酸とそれをコードするDNA配列（塩基番号76-891）の模式図。（ウィルクス, A. F. ら, Mol. Cell Biol. 11:2057-2065 (1991)）。ヌクレオチド番号は公開された配列（ヌクレオチド76から始まりヌクレオチド3504で終了する）である。

【図5】図4と同様、ヒトJak1アミノ酸配列とそれをコードするDNA配列（塩基番号892-1755）の模式図。

【図6】図4、5と同様、ヒトJak1アミノ酸配列とそれをコードするDNA配列（塩基番号1756-2619）の模式図。

【図7】図4、5、6と同様、ヒトJak1アミノ酸配列とそれをコードするDNA配列（塩基番号2620-

3504）の模式図。

【図8】ヒトTyk2キナーゼの公開されたアミノ酸とそれをコードするDNA配列（塩基番号307-1122）の模式図。（ファームバツハークラフト, I. ら, Oncogene 5:1329-1336 (1990)）。ヌクレオチド番号は、公開された配列のものを、ヌクレオチド307から始まりヌクレオチド3867で終了する。

【図9】図8と同様、ヒトTyk2アミノ酸配列とそれをコードするDNA配列（塩基番号1123-1986）の模式図。

【図10】図8、9と同様、ヒトTyk2アミノ酸配列とそれをコードするDNA配列（塩基番号1987-2850）の模式図。

【図11】図8、9、10と同様、ヒトTyk2アミノ酸配列とそれをコードするDNA配列（塩基番号2851-3714）の模式図。

【図12】図8、9、10、11と同様、ヒトTyk2アミノ酸配列とそれをコードするDNA配列（塩基番号3715-3867）の模式図。

【図13】IL-3賦活による免疫沈降物中のJak2インビトロキナーゼ活性の活性化を示すオートラジオグラフィの模写図。

【図14】Jakキナーゼアミノ酸配列を比較して示した模式図。比較は、インテリゲネティックスコンピュタープログラム「Pileup」を用いて得た、Jak1（1行目）、Tyk2（2行目）およびJak2（3行目）および共通配列（4行目）のアミノ酸配列を示す（多重度=2.00；閾値=1.0；Aveウエイト=1.00；Aveマッチ=0.54；Avマスマッチ=-0.4）。

【図15】図14と同様、Jakキナーゼアミノ酸配列を比較して示した模式図。

【図16】図14、15と同様、Jakキナーゼアミノ酸配列を比較して示した模式図。

【図17】図14、15、16と同様、Jakキナーゼアミノ酸配列を比較して示した模式図。

【図1】

CGCGGGAACAAGATGTGAAGTGTCTTTCCTCCG 33

CAGAAGAGAGCGCTTTTTCCTCCGCGAAGCGCAATGTCTGCAAAAAAGCTCTAG 93

ATCGGAATGCGCTGCTTACAATGACAGAAATCGAGCAAGCTCCACATCTCTGTACAT 153
H G H A C L T N T E N E A T S T S P V K 20

CACAATGCTGATATTCTGGAAGTCTAATCTGTGAAGCAGATAGAGCCAGTCTTCAA 213
Q H G D I P G S A H S V K Q I E P V L Q 40

GTGTATCTGTACATTCTCTTGGCAAGCTGAAGAGAGTATCTGAAGTTTCCAAGTGA 273
V Y L Y H S L G Q A E C E Y L K F P S G 60

CAGTATGTTCCAGAGAAATTTCTGTGCTGCTTCTAAAGCTTGTGTTTACCGCTGTG 333
E Y V A E E I C V A A S K A C G I T P V 80

TATCATAATATGTTTGGTTAATGAGTGAAGCGAAGAGATGCTGACCCAGCCCAATCAT 393
Y H H H F A L H S E T E R I W Y P P H H 400

GTCTTCCACATAGAGGAGTCAACCCAGGATGACATATCTACAGGATAAGGTTTACTTC 453
V F H I D E S T R H D I L Y R I R P Y F 420

CCTCATTGCTACTGTAGTCCGACCCAGCAACCTACAGATAGGAGTGTCCCTGCGGCT 513
P H W Y C S G S S R T Y R Y G V S R G A 440

GAAGCTCTCTGCTGATGACTTTGTCATGCTTACCTTTTCTGCTGAGTCCCGGATCAT 573
E A P L L D D F V H S Y L F A Q W R H D 480
S P

TTTCTTCAGCGATGCAAAAAGTACCTGTGACTCATGAAGTCAAGAGTGTCTTCCG 633
F V H C W I K V P V T H E T Q E E C L G 480

ATGCGCGTGTACAGATGATGACAATAGCTAAGCAGAAAGAGAGTCCAGTCTGCTGTC 693
H A V L D H H R I A K E K D Q T P L A V 400

TATAAGTGTGTCAGTACAGACATTTTACCAAGTGGCTTCCAGGAGATCCAAGAC 753
Y H S V S Y K T F L P K C V R A K E Q D 420

TATCAGATTTTAAAGCGAAGCGAATCAGCTACAGATTTCCAGATTCATTGAGCAATTC 813
Y H I L T R K R I R Y R F R R F I Q Q F 440

AGTCAATGTAAAGCCAGTCCAGCAAGCTTAAAGTAAATATCTTATAAAGCTGGAAGCC 873
S Q C K A T A R H L K L K Y L I N L E T 460

CTGCAGTCTGCTTCTACAGAGAGCTTTGAAGTAAAGAAATCTGCAAGAGCTCTTCA 933
L Q S A P Y T E Q F E V K E S A R G P S 480

CGTCAGGAGATTTTCCAGCAATTATAAAGTGAAGCGGTGCAATTGAGTCTGCAAGA 993
G E E I P A T I I I T G N G C I Q W S R 400

CGGAACATAAGCAAGTCAACACTCAGACAGAGAGGAGTACAGTTATATTGCAATTTC 1053
C K H K E S E T L T E Q D V Q L Y C D F 420

CCTCATATTATGATGTCAGTATTAAAGCAAGCAAGCAGCAATGCTCAAAATGAAAGTACA 1113
P D I I D V S I K Q A H Q E C S H E S R 440

ATTGTAAGTGTGCAATAAGAGATCGTAAAGTTTTCAGATAGAACTTAGCTCATTAAAA 1173
I V T V H K Q D C K V L E I E L S S L K 460
V

【図2】

CAAGCGCTGTCATTGGTGTCTATTAAATGACCGCTATTACAGACTAACTCCGATCCGCAC 1213
 E A L S F V S L I D G Y Y R L T A D A H 380

CATTACCTCTGCAAGAGGTGGCTCCGCCAGCTCTCTCTCCAGACATACACAGCAACTGC 1293
 H Y L C K E V A P P A V L E N I H S H C 400

CAAGGCCCAATATCAATGCAATTTTCCATTACCAAACTAAAGAAAGCCGCTAAACAGACT 1353
 H C P I S K D F A I S K L K K A G N Q T 420

GGACTATATGTGCTACCATGCGAGCGCTAACGACTTCAACAAATACCTTTCTGACCTTTGCT 1413
 C L I V L R C S P K D F N K Y F L T F A 440

GTTCAGCGCAAAATGTCATTCAATATAAAGACTGTTTCATTACGAAGATCAGAAATGCA 1473
 V E R E N V I E Y K H C L I T K N E N C 460

GAATACAACTCAGCGCGACTAACAGCACTTCACTAAAGCTTAAGGACCTTTTGAATTC 1533
 E Y K L S G T K R N F S N L K D L L N C 480

TACCAGATCGAAACTCTCCGCTCAGACAGTATCATCTTCCAGTTTACCAAAATGCTGCCGC 1593
 Y Q H E T V R S D S I I F Q P T K C C P 500

CCAAGCCAAAGATAAATCAAGCTTCTGCTCTCAGAACAAATGCTATTCTCATGTT 1653
 P K P K D K S N L L V F R T H G I S D V 520

CAGATCTCAAGACATTACAGAGCGATAAATGTCATCAATCGCTTTTACAAAATC 1713
 Q I S P T L Q R H N N V N Q H V F N K I 540

AGCATCAAGATTATATATTTAATGAAAGTCTTCCGCAAGCTACTTTTACAAAAATTTT 1773
 R N E D L I F N E S L C Q G T F T K I F 560

AAAGCTGTAGACAGAGGTTGCGATTATGCTCAACTCCACAAAACCGAAGTCTTTTG 1833
 K C V R R R E V G D Y G Q L H K T E V L L 580

AAGTCTAGATAAGCCATAGCAACTATTACAGACTCTTTCTTGAAGCAGCAAGCATG 1893
 K V L D K A K R N Y S E S F F E A A S K 600

ATGACTCAGCTTCTCAGACAGCTTTCTTTCAATTATGCTGTCTGTCTGTCTGAGAG 1953
 H S Q L S H K H L V L N Y G V C V C C E 620

CAGAACATTCTGCTCAAGCAATTTGTAATTTGGATCACTGATACATACCTGAAGAAC 2013
 E N I L V Q E F V K F G S L D T Y L K K 640

AACAAAATTCATATAATATATTATGAAAGTTCAGTGGCTAAGCAGTTCCCATGCCGC 2073
 N K N S I N I L W K L G V A K Q L A W A 660

ATCCATTTCTAGAACAAAATCCCTTATTCATGCGAATGTGTCTGCTAAAAATATCCTG 2133
 H K F L K E K S L I N G M V C A K N I L 680

CTTATCAGAGAAGACAGAGGAGAACGGGGAAGCCAGCTTTTCATCAAACTTACTCATCT 2193
 L I R E E D R R T G M P P F I K L S D P 700

GGCATTACGATTACAGTTGTACGCAAGCAGCTTTTACGACACAATACCATCCGTAAGT 2253
 G I S I T V L P K D I L Q E R I F W V P 720

CCTGAATTCAGATTCATAAATCTCAATCTGCCAACAGACAAGTGGAGCTTCCGC 2313
 P E C I E N P K N L M L A T D K W S F G 740

ACCACTCTGTGGAGATCTGCGAGTGCAGGAGATAAGCCGCTGCTCTGCAATTCTCAA 2373
 T T L W E I C S C G D K P L S A L D S Q 760

【図3】

AGAAGCTGCACTTCTATCAAGATAAGCATCAGCTTCTGCAACCAAGTCCACACAGTTA⁹ 2423
 R K L Q F Y E D K H Q L P A P K V T E L 780

GCAAACTTATAAATAATTGCATGGACTATGACCCAGATTTCAGGCTGCTTTACAGCT 2493
 A N L I N K C K D Y E P D F R P A F R A 800

GTCATCGTGATCTTAACAGCGCTGTTACTCCAGATTATGAAGTACTAAACAGAAATGAC 2553
 V I R D L N S L F T P D Y E L L T E N D 820

ATCTACCAACATGCAATAGCTGCCCTAGCGTTTCTGCTGCTTTTGAAGACAGCGAC 2613
 M L P N K R I G A L C F S C A F E D R D 840

CCTACACAGTTTGAAGAGAGACACTTGAAGTTTCTAGACAGCTTCCCAAGGTAAGTTC 2673
 P T Q F E E R H L K F L Q Q L G K G N F 860

GCGAGTGTGAGATGTGCGCTATGACCGGCTGCAAGCAACACTGCGGAGCTGCTGCT 2733
 C S V E K C R Y D P L Q D N T G E V V A 880

GTGAAGAACTCCAGCACAGCACTGAAGAGCACTCCGACACTTTGACAGCGACATCCAG 2793
 V K K L O H S T E E H L R D F F R E I E 900

ATCTGAATCTGTCAGCATGACAACATGCTCAAGTACAAGCCAGCTGCTTACAGTCC 2853
 I L K S L Q H D K I V K Y K G V C Y S A 920

CGTCCGCGCAAGCTAAGATTATATGCAATATTTACCATATCCAGCTTTACGACAGTAT 2913
 G R R N L R L I H E Y L P Y G S L R D Y 940

CTCAAAAACATAAAGAACCGATAGATCAGAAAAACTTCTTCAATACACATCTCAGATA 2973
 L Q K N K E R I D H K K L L Q Y T S Q I 960

TCCAAAGGATGCAATATCTTGTACAAAAAGCTATATCCACAGCCAGCTGCCAACAAG 3033
 C K C H E Y L C T K R Y I N R D L A T R 980

AACATATTGCTGCAAAATGAGAACCGCTTAAATAGCAGACTTCCGATTAAACAAAGTC 3093
 M I L V E N E N R V K I C D F G L T K V 1000

TTGCGCAGGACAAAGATACTACAAAGTAAAGCAGCCAGCCGCAAGCCCATATTCTGC 3153
 L P Q D K E Y Y K V K E P G E S P I F W 1020

TAAGCACTGAATCTTGAAGGAGAGCAAGTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTT 3213
 Y A P E E L T E S K F S V A S D V W S F 1040

GCACTGCTTCTATAGCAACTTTTACATACATGAGAACACTAAAGTCCAGCCGCTGAA 3273
 G V V L Y E L F T Y I E K S K E F F V E 1060

TTTATGCAATGATTGCAATGATAAACAAGCCCAATCATTTCTTCCATTTCATAGAC 3333
 F N R K I G N D K Q C Q N I V F H L I E 1080

CTACTGAAGAGCAAGGAGATTGCCAAGCCAGAACCATCCGACATGAGATTTATGTG 3393
 L L K S K C R L P R P E G C F D E I Y V 1100

ATCATGACAGAGTCTGCAACAACAATGAGCCAGCGTCCCTGCTTACGGGAGCTTTG^C 3453
 I K T E C V N K N V S Q R F S F R D L S 1120

TTGCGCTGATCAAAATCCGCGACATATAGCTCCGTCAGAGAGATGCGCTTCACTCAGAG 3513
 F G W I K S G T V > 1129

ACCAAGCAGACTTCCAGAACAGAACAAAGCTCTCTAGCCTTCTGCTACACATGCTTAT 3573

^C (4) (4) (4)
 CATGATGCTAGCTAGCCACAACAAGCTGCAAGCGCTCTGCTCAAGCTTTGCTTC 3629

【図4】

ヒト JAK1

ATG GCT TTC TGT CCT AAA ATG AGG AGC TCC AAG AAG ACT GAG GTG AAC Met Ala Phe Cys Ala Lys Met Arg Ser Ser Lys Lys Thr Glu Val Asn	123 16
CTG GAG GCC CCT GAG CCA GGG GTG GAA GTG ATC TTC TAT CTG TCG GAC Leu Glu Ala Pro Glu Pro Gly Val Glu Val Ile Phe Tyr Leu Ser Asp	171 32
AGG GAG CCC CTC CGG CTG GGC AGT GGA GAG TAC ACA GCA GAG GAA CTG Arg Glu Pro Leu Arg Leu Gly Ser Gly Glu Tyr Thr Ala Glu Glu Leu	219 48
TGC ATC AGG GCT GCA CAG GCA TGC CGT ATC TCT CCT CTT TGT CAC AAC Cys Ile Arg Ala Ala Gln Ala Cys Arg Ile Ser Pro Leu Cys His Asn	267 64
CTC TTT GCC CTG TAT GAC GAG AAC ACC AAG CTC TGG TAT GCT CCA AAT Leu Phe Ala Leu Tyr Asp Glu Asn Thr Lys Leu Trp Tyr Ala Pro Asn	315 80
CGC ACC ATC ACC GTT GAT GAC AAG ATG TCC CTC CGG CTC CAC TAC CGG Arg Thr Ile Thr Val Asp Asp Lys Met Ser Leu Arg Leu His Tyr Arg	363 96
ATG AGG TTC TAT TTC ACC AAT TGG CAT GGA ACC AAC GAC AAT GAG CAG Met Arg Phe Tyr Phe Thr Asn Trp His Gly Thr Asn Asp Asn Glu Gln	411 112
TCA GTG TGG CGT CAT TCT CCA AAG AAG CAG AAA AAT GGC TAC GAG AAA Ser Val Trp Arg His Ser Pro Lys Lys Gln Lys Asn Gly Tyr Glu Lys	459 128
AAA AAG ATT CCA GAT GCA ACC CCT CTC CTT GAT GCC AGC TCA CTG GAG Lys Lys Ile Pro Asp Ala Thr Pro Leu Leu Asp Ala Ser Ser Leu Glu	507 144
TAT CTG TTT GCT CAG GGA CAG TAT GAT TTG GTG AAA TGC CTC GCT CCT Tyr Leu Phe Ala Gln Gly Gln Tyr Asp Leu Val Lys Cys Leu Ala Pro	555 160
ATT CGA GAC CCC AAG ACC GAG CAG GAT GGA CAT GAT ATT GAG AAC GAG Ile Arg Asp Pro Lys Thr Glu Gln Asp Gly His Asp Ile Glu Asn Glu	603 176
TGT CTA GGG ATG GCT GTC CTG GCC ATC TCA CAC TAT GCC ATG ATG AAG Cys Leu Gly Met Ala Val Leu Ala Ile Ser His Tyr Ala Met Met Lys	651 192
AAG ATG CAG TTG CCA GAA CTG CCC AAG GAC ATC AGC TAC AAG CGA TAT Lys Met Gln Leu Pro Glu Leu Pro Lys Asp Ile Ser Tyr Lys Arg Tyr	699 208
ATT CCA GAA ACA TTG AAT AAG TCC ATC AGA CAG AGG AAC CTT CTC ACC Ile Pro Glu Thr Leu Asn Lys Ser Ile Arg Gln Arg Asn Leu Leu Thr	747 224
AGG ATG CGG ATA AAT AAT GTT TTC AAG GAT TTC CTA AAG GAA TTT AAC Arg Met Arg Ile Asn Asn Val Phe Lys Asp Phe Leu Lys Glu Phe Asn	795 240
AAC AAG ACC ATT TGT GAC AGC AGC GTG TCC ACG CAT GAC CTG AAG GTG Asn Lys Thr Ile Cys Asp Ser Ser Val Ser Thr His Asp Leu Lys Val	843 256
AAA TAC TTG GCT ACC TTG GAA ACT TTG ACA AAA CAT TAC GGT GCT GAA Lys Tyr Leu Ala Thr Leu Glu Thr Leu Thr Lys His Tyr Gly Ala Glu	891 272

【図5】

ATA TTT GAG ACT TCC ATG TTA CTG ATT TCA TCA GAA AAT GAG ATG AAT Ile Phe Glu Thr Ser Met Leu Leu Ile Ser Ser Glu Asn Glu Met Asn	939 288
TGG TTT CAT TCG AAT GAC GGT GGA AAC GTT CTC TAC TAC GAA GTG ATG Trp Phe His Ser Asn Asp Gly Gly Asn Val Leu Tyr Tyr Glu Val Met	987 304
GTG ACT CGC AAT CTT GGA ATC CAG TGG AGG CAT AAA CCA AAT GTT GTT Val Thr Gly Asn Leu Gly Ile Gln Trp Arg His Lys Pro Asn Val Val	1035 320
TCT GTT GAA AAG GAA AAA AAT AAA CTG AAG CGG AAA AAA CTG GAA AAT Ser Val Glu Lys Glu Lys Asn Lys Leu Lys Arg Lys Lys Leu Glu Asn	1083 336
AAA GAC AAG AAG GAT GAG GAG AAA AAC AAG ATC CGG GAA GAG TGG AAC Lys Asp Lys Lys Asp Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Glu Trp Asn	1131 352
AAT TTT TCA TTC TTC CCT GAA ATC ACT CAC ATT GTA ATA AAG GAG TCT Asn Phe Ser Phe Phe Pro Glu Ile Thr His Ile Val Ile Lys Glu Ser	1179 368
GTG GTC AGC ATT AAC AAG CAG GAC AAC AAG AAA ATG GAA CTG AAG CTC Val Val Ser Ile Asn Lys Gln Asp Asn Lys Lys Met Glu Leu Lys Leu	1227 384
TCT TCC CAC GAG GAG GCC TTG TCC TTT GTG TCC CTG GTA GAT GGC TAC Ser Ser His Glu Glu Ala Leu Ser Phe Val Ser Leu Val Asp Gly Tyr	1275 400
TTC CGG CTC ACA GCA GAT GCC CAT CAT TAC CTC TGC ACC GAC GTG GCC Phe Arg Leu Thr Ala Asp Ala His His Tyr Leu Cys Thr Asp Val Ala	1323 416
CCC CGG TTG ATC GTC CAC AAC ATA CAG AAT GGC TGT CAT GGT CCA ATC Pro Pro Leu Ile Val His Asn Ile Gln Asn Gly Cys His Gly Pro Ile	1371 432
TGT ACA GAA TAC GCC ATC AAT AAA TTG CCG CAA GAA GGA AGC GAG GAG Cys Thr Glu Tyr Ala Ile Asn Lys Leu Arg Gln Glu Gly Ser Glu Glu	1419 448
CGG ATG TAC GTG CTG AGG TGG AGC TGC ACC GAC TTT GAC AAC ATC CTC Gly Met Tyr Val Leu Arg Trp Ser Cys Thr Asp Phe Asp Asn Ile Leu	1467 464
ATG ACC GTC ACC TGC TTT GAG AAG TCT GAG CAG GTG CAG GGT GCC CAG Met Thr Val Thr Cys Phe Glu Lys Ser Glu Gln Val Gln Gly Ala Gln	1515 480
AAG CAG TTC AAG AAC TTT CAG ATC CAG GTG CAG AAG GGC CGC TAC AGT Lys Gln Phe Lys Asn Phe Gln Ile Glu Val Gln Lys Gly Arg Tyr Ser	1563 496
CTG CAC GGT TCG GAC CGC AGC TTC CCC AGC TTG GCA GAC CTC ATG AGC Leu His Gly Ser Asp Arg Ser Phe Pro Ser Leu Gly Asp Leu Met Ser	1611 512
CAC CTC AAG AAG CAG ATC CTG CGC ACG GAT AAC ATC AGC TTC ATG CTA His Leu Lys Lys Gln Ile Leu Arg Thr Asp Asn Ile Ser Phe Met Leu	1659 528
AAA CGC TGC TGC CAG CCC AAG CCC CGA GAA ATC TCC AAC CTG CTG GTG Lys Arg Cys Cys Gln Pro Lys Pro Arg Glu Ile Ser Asn Leu Leu Val	1707 544
GCT ACT AAG AAA GCC CAG GAG TGG CAG CCC GTC TAC CCC ATG AGC CAG Ala Thr Lys Lys Ala Gln Glu Trp Gln Pro Val Tyr Pro Met Ser Gln	1755 560

【図6】

CTG AGT TTC GAT CCG ATC CTC AAG AAG GAT CTG GTG CAG GGC GAG CAC Leu Ser Phe Asp Arg Ile Leu Lys Lys Asp Leu Val Gln Gly Glu His	1803 576
CTT GGG AGA GGC ACG AGA ACA CAC ATC TAT TCT GGG ACC CTG ATG GAT Leu Gly Arg Gly Thr Arg Thr His Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Met Asp	1851 592
TAC AAG GAT GAC GAA CGA ACT TCT GAA GAG AAG AAG ATA AAA GTG ATC Tyr Lys Asp Asp Glu Gly Thr Ser Glu Glu Lys Lys Ile Lys Val Ile	1899 608
CTC AAA GTC TTA GAC CCC AGC CAC AGG GAT ATT TCC CTG CCC TTC TTC Leu Lys Val Leu Asp Pro Ser His Arg Asp Ile Ser Leu Ala Phe Phe	1947 624
GAG GCA GCC AGC ATG ATG AGA CAG GTC TCC CAC AAA CAC ATC GTG TAC Glu Ala Ala Ser Met Met Arg Gln Val Ser His Lys His Ile Val Tyr	1995 640
CTC TAT GGC GTC TGT GTC CGC GAC GTG GAG AAT ATC ATG GTG GAA GAG Leu Tyr Gly Val Cys Val Arg Asp Val Glu Asn Ile Met Val Glu Glu	2043 656
TTT GTG GAA GGG GGT CCT CTG GAT CTC TTC ATG CAC CGG AAA AGT GAT Phe Val Glu Gly Gly Pro Leu Asp Leu Phe Met His Arg Lys Ser Asp	2091 672
GTC CTT ACC ACA CCA TGG AAA TTC AAA GTT GCC AAA CAG CTG GCC AGT Val Leu Thr Thr Pro Trp Lys Phe Lys Val Ala Lys Gln Leu Ala Ser	2139 688
GCC CTG AGC TAC TTG GAG GAT AAA GAC CTG GTC CAT GGA AAT GTG TGT Ala Leu Ser Tyr Leu Glu Asp Lys Asp Leu Val His Gly Asn Val Cys	2187 704
ACT AAA AAC CTC CTC CTG GCC CGT GAG GCA ATC GAC AGT GAG TGT GGC Thr Lys Asn Leu Leu Leu Ala Arg Glu Gly Ile Asp Ser Glu Cys Gly	2235 720
CCA TTC ATC AAG CTC AGT GAC CCC GGC ATC CCC ATT ACG GTG CTG TCT Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Ile Pro Ile Thr Val Leu Ser	2283 736
AGG CAA GAA TGC ATT GAA CGA ATC CCA TGG ATT GCT CCT GAG TGT GTT Arg Gln Glu Cys Ile Glu Arg Ile Pro Trp Ile Ala Pro Glu Cys Val	2331 752
GAG GAC TCC AAG AAC CTG AGT GTC GCT GCT GAC AAG TGG AGC TTT GGA Glu Asp Ser Lys Asn Leu Ser Val Ala Ala Asp Lys Trp Ser Phe Gly	2379 768
ACC ACG CTC TGG GAA ATC TGC TAC AAT GGC GAG ATC CCC TTC AAA GAC Thr Thr Leu Trp Glu Ile Cys Tyr Asn Gly Glu Ile Pro Leu Lys Asp	2427 784
AAG ACG CTG ATT GAG AAA GAG AGA TTC TAT GAA AGC CGG TGC AGG CCA Lys Thr Leu Ile Glu Lys Glu Arg Phe Tyr Glu Ser Arg Cys Arg Pro	2475 800
GTG ACA CCA TCA TGT AAG GAG CTG GCT GAC CTC ATG ACC CGC TGC ATG Val Thr Pro Ser Cys Lys Glu Leu Ala Asp Leu Met Thr Arg Cys Met	2523 816
AAC TAT GAC CCC AAT CAG AGC CCT TTC TTC CGA GCC ATC ATG AGA GAC Asn Tyr Asp Pro Asn Gln Arg Pro Phe Phe Arg Ala Ile Met Arg Asp	2571 832
ATT AAT AAG CTT GAA GAG CAG AAT CCA GAT ATT GTT TCC AGA AAA AAA Ile Asn Lys Leu Glu Glu Gln Asn Pro Asp Ile Val Ser Arg Lys Lys	2619 848

【図7】

AAC CAG CCA ACT GAA GTG GAC CCC ACA CAT TTT GAG AAG CGC TTC CTA Asn Gln Pro Thr Glu Val Asp Pro Thr His Phe Glu Lys Arg Phe Leu	2667 864
AAG AGG ATC CGT GAC TTG GGA GAG GGC CAC TTT GGG AAG GTT GAG CTC Lys Arg Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Glu Leu	2715 880
TGC AGG TAT GAC CCC GAA GAC AAT ACA GGG GAG CAG GTG GCT GTT AAA Cys Arg Tyr Asp Pro Glu Asp Asn Thr Gly Glu Gln Val Ala Val Lys	2763 896
TCT CTG AAG CCT GAG AGT GGA GGT AAC CAC ATA GCT GAT CTG AAA AAG Ser Leu Lys Pro Glu Ser Gly Gly Asn His Ile Ala Asp Leu Lys Lys	2811 912
GAA ATC GAG ATC TTA AGG AAC CTC TAT CAT GAG AAC ATT GTG AAG TAC Glu Ile Glu Ile Leu Arg Asn Leu Tyr His Glu Asn Ile Val Lys Tyr	2859 928
AAA GCA ATC TGC ACA GAA GAC GGA GGA AAT GGT ATT AAG CTC ATC ATG Lys Gly Ile Cys Thr Glu Asp Gly Gly Asn Gly Ile Lys Leu Ile Met	2907 944
GAA TTT CTG CCT TCG GGA AGC CTT AAG GAA TAT CTT CCA AAG AAT AAG Glu Phe Leu Pro Ser Gly Ser Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Lys Asn Lys	2955 960
AAC AAA ATA AAC CTC AAA CAG CAG CTA AAA TAT GCC GTT CAG ATT TGT Asn Lys Ile Asn Leu Lys Gln Gln Leu Lys Tyr Ala Val Gln Ile Cys	3003 976
AAG GGG ATG GAC TAT TTG GGT TCT CGG CAA TAC GTT CAC CGG GAC TTG Lys Gly Met Asp Tyr Leu Gly Ser Arg Gln Tyr Val His Arg Asp Leu	3051 992
GCA GCA AGA AAT CTC CTT GTT GAG AGT GAA CAC CAA GTG AAA ATT GGA Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Glu Ser Glu His Gln Val Lys Ile Gly	3099 1008
GAC TTC GGT TTA ACC AAA GCA ATT GAA ACC GAT AAG GAG TAT TAC ACC Asp Phe Gly Leu Thr Lys Ala Ile Glu Thr Asp Lys Glu Tyr Tyr Thr	3147 1024
GTC AAG GAT GAC CGG GAC AGC CCT GTG TTT TGG TAT GCT CCA GAA TGT Val Lys Asp Asp Arg Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu Cys	3195 1040
TTA ATG CAA TCT AAA TTT TAT ATT GCC TCT GAC GTC TGG TCT TTT GGA Leu Met Gln Ser Lys Phe Tyr Ile Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly	3243 1056
GTC ACT CTG CAT GAG CTG CTG ACT TAC TGT GAT TCA GAT TCT AGT CCC Val Thr Leu His Glu Leu Leu Thr Tyr Cys Asp Ser Asp Ser Ser Pro	3291 1072
ATG GCT TTG TTC CTG AAA ATG ATA GGC CCA ACC CAT GGC CAG ATG ACA Met Ala Leu Phe Leu Lys Met Ile Gly Pro Thr His Gly Gln Met Thr	3339 1088
GTC ACA AGA CTT GTG AAT ACG TTA AAA GAA GGA AAA CGC CTG CCG TGC Val Thr Arg Leu Val Asn Thr Leu Lys Glu Gly Lys Arg Leu Pro Cys	3387 1104
CCA CCT AAC TGT CCA GAT GAG GTT TAT CAG CTT ATG AGA AAA TGC TGG Pro Pro Asn Cys Pro Asp Glu Val Tyr Gln Leu Met Arg Lys Cys Trp	3435 1120
GAA TTC CAA CCA TCC AAT CGG ACA AGC TTT CAG AAC CTT ATT GAA GGA Glu Phe Gln Pro Ser Asn Arg Thr Ser Phe Gln Asn Leu Ile Glu Gly	3483 1136
TTT GAA GCA CTT TTA AAA TAA Phe Glu Ala Leu Leu Lys	3504 1143

【図8】

ヒト TYK2

ATG CCT CTG CGC CAC TGG GGG ATG GCC AGG GGC AGT AAG CCC GTT GGG Met Pro Leu Arg His Trp Gly Met Ala Arg Gly Ser Lys Pro Val Gly	354 16
GAT GGA GCC CAG CCC ATG GCT GCC ATG GGA GGC CTG AAG CTG CTT CTG Asp Gly Ala Gln Pro Met Ala Ala Met Gly Gly Leu Lys Val Leu Leu	402 32
CAC TGG GCT GGT CCA GGC GGC GGG GAG CCC TGG GTC ACT TTC AGT GAG His Trp Ala Gly Pro Gly Gly Gly Glu Pro Trp Val Thr Phe Ser Glu	450 48
TCA TCG CTG ACA GCT GAG GAA GTC TGC ATC CAC ATT GCA CAT AAA GTT Ser Ser Leu Thr Ala Glu Glu Val Cys Ile His Ile Ala His Lys Val	498 64
GGT ATC ACT CCT CCT TGC TTC AAT CTC TTT GCC CTC TTC GAT GCT CAG Gly Ile Thr Pro Pro Cys Phe Asn Leu Phe Ala Leu Phe Asp Ala Gln	546 80
GCC CAA GTC TGG TTG CCC CCA AAC CAC ATC CTA GAG ATC CCC AGA GAT Ala Gln Val Trp Leu Pro Pro Asn His Ile Leu Glu Ile Pro Arg Asp	594 96
GCA AGC CTG ATG CTA TAT TTC CGC ATA AGG TTT TAT TTC CGG AAC TGG Ala Ser Leu Met Leu Tyr Phe Arg Ile Arg Phe Tyr Phe Arg Asn Trp	642 112
CAT GGC ATG AAT CCT CGG GAA CCG GCT GTG TAC CGT TGT GGG CCC CCA His Gly Met Asn Pro Arg Glu Pro Ala Val Tyr Arg Cys Gly Pro Pro	690 128
GGA ACC GAG GCA TCC TCA GAT CAG ACA GCA CAG GGG ATG CAA CTC CTG Gly Thr Glu Ala Ser Ser Asp Gln Thr Ala Gln Gly Met Gln Leu Leu	738 144
GAC CCA GCC TCA TTT GAG TAC CTC TTT GAG CAG GGC AAG CAT GAG TTT Asp Pro Ala Ser Phe Glu Tyr Leu Phe Glu Gln Gly Lys His Glu Phe	786 160
GTG AAT GAC GTG GCA TCA CTG TGG GAG CTG TCG ACC GAG GAG GAG ATC Val Asn Asp Val Ala Ser Leu Trp Glu Leu Ser Thr Glu Glu Glu Ile	834 176
CAC CAC TTT AAG AAT GAG AGC CTG GGC ATG GCC TTT CTG CAC CTC TGT His His Phe Lys Asn Glu Ser Leu Gly Met Ala Phe Leu His Leu Cys	882 192
CAC CTC GCT CTC CGC CAT GGC ATC CCC CTG GAG GAG GTG GCC AAG AAG His Leu Ala Leu Arg His Gly Ile Pro Leu Glu Glu Val Ala Lys Lys	930 208
ACC ACC TTC AAG GAC TGC ATC CCG CGC TCC TTC CGC CGG CAT ATC CGG Thr Ser Phe Lys Asp Cys Ile Pro Arg Ser Phe Arg Arg His Ile Arg	978 224
CAG CAC AGC GCC CTG ACC CGG CTG CGC CTT CGG AAC GTC TTC CGC AGG Gln His Ser Ala Leu Thr Arg Leu Arg Leu Arg Asn Val Phe Arg Arg	1026 240
TTC CTG CGG GAC TTC CAG CCG GGC CGA CTC TCC CAG CAG ATG GTC ATG Phe Leu Arg Asp Phe Gln Pro Gly Arg Leu Ser Gln Gln Met Val Met	1074 256
GTC AAA TAC CTA GCC ACA CTC GAG CGG CTG GCA CCC CGC TTC GGC ACA Val Lys Tyr Leu Ala Thr Leu Glu Arg Leu Ala Pro Arg Phe Gly Thr	1122 272

【図9】

GAG CGT GTG CCC GTG TGC CAC CTG AGG CTG CTG GCC CAG GCC GAG GGG Glu Arg Val Pro Val Cys His Leu Arg Leu Leu Ala Gln Ala Glu Gly	1170 288
GAG CCC TGC TAC ATC CGG GAC AGT GGG GTG GCC CCT ACA GAC CCT GGC Glu Pro Cys Tyr Ile Arg Asp Ser Gly Val Ala Pro Thr Asp Pro Gly	1218 304
CCT GAG TCT GCT GCT GGG CCC CCA ACC CAC GAG GTG CTG GTG ACA GGC Pro Glu Ser Ala Ala Gly Pro Pro Thr His Glu Val Leu Val Thr Gly	1266 320
ACT GGT GGC ATC CAG TGG TGG CCA CTA GAG GAG GAG GTG AAC AAG GAG Thr Gly Gly Ile Gln Trp Trp Pro Val Glu Glu Glu Val Asn Lys Glu	1314 336
GAG GGT TCT AGT GGC AGC AGT GGC AGC AAC CCC CAA GCC AGC CTG TTT Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Arg Asn Pro Gln Ala Ser Leu Phe	1362 352
GGG AAG AAG GCC AAG GCT CAC AAG GCA TTC GGC CAG CCG GCA GAC AGG Gly Lys Lys Ala Lys Ala His Lys Ala Phe Gly Gln Pro Ala Asp Arg	1410 368
CCG CGG GAG CCA CTG TGG GCC TAC TTC TGT GAC TTC CGG GAC ATC ACC Pro Arg Glu Pro Leu Trp Ala Tyr Phe Cys Asp Phe Arg Asp Ile Thr	1458 384
CAC GTG GTG CTG AAA GAG CAC TGT GTC AGC ATC CAC CGG CAG GAC AAC His Val Val Leu Lys Glu His Cys Val Ser Ile His Arg Gln Asp Asn	1506 400
AAG TGC CTG GAG CTG AGC TTG CCT TCC CGG GCT GCG GCG CTG TCC TTC Lys Cys Leu Glu Leu Ser Leu Pro Ser Arg Ala Ala Ala Leu Ser Phe	1554 416
GTG TCG CTG CTG GAC GGC TAT TTC CGC CTG ACG GCC GAC TCC AGC CAC Val Ser Leu Val Asp Gly Tyr Phe Arg Leu Thr Ala Asp Ser Ser His	1602 432
TAC CTG TGC CAC GAG GTG GCT CCC CCA CGG CTG GTG ATG AGC ATC CGG Tyr Leu Cys His Glu Val Ala Pro Pro Arg Leu Val Met Ser Ile Arg	1650 448
GAT GGG ATC CAC GGA CCC CTG CTG GAG CCA TTT GTG CAG GCC AAG CTG Asp Gly Ile His Gly Pro Leu Leu Glu Pro Phe Val Gln Ala Lys Leu	1698 464
CGG CCC GAG GAC GGC CTG TAC CTC ATT CAC TGG AGC ACC AGC CAC CCC Arg Pro Glu Asp Gly Leu Tyr Leu Ile His Trp Ser Thr Ser His Pro	1746 480
TAC CGC CTG ATC CTC ACA GTG GCC CAG CGT AGC CAG GCA CCA GAC GGC Tyr Arg Leu Ile Leu Thr Val Ala Gln Arg Ser Gln Ala Pro Asp Gly	1794 496
ATG CAG AGC TTG CGG CTC CGA AAG TTC CCC ATT GAG CAG CAG GAC GGG Met Gln Ser Leu Arg Leu Arg Lys Phe Pro Ile Glu Gln Gln Asp Gly	1842 512
CCC TTC GTG CTG GAG GGC TGG GGC CGG TCC TTC CCC AGC GTT CGG GAA Ala Phe Val Leu Glu Gly Trp Gly Arg Ser Phe Pro Ser Val Arg Glu	1890 528
CIT GGC GCT GCC TTC CAG GGC TGC TTG CTG AGG GCC GGG GAT GAC TGC Leu Gly Ala Ala Leu Gln Gly Cys Leu Leu Arg Ala Gly Asp Asp Cys	1938 544
TTC TCT CTG CGT CGC TGT TGC CTG CCC CAA CCA GGA GAA ACC TCC AAT Phe Ser Leu Arg Arg Cys Cys Leu Pro Gln Pro Gly Glu Thr Ser Asn	1986 560

【図10】

CTC ATC ATC ATG CGG GGG GCT CGG GCC AGC CCC AGG ACA CTC AAC CTC Leu Ile Ile Met Arg Gly Ala Arg Ala Ser Pro Arg Thr Leu Asn Leu	2034 576
AGC CAG CTC AGC TTC CAC CGG GTT GAC CAG AAG GAG ATC ACC CAG CTG Ser Gln Leu Ser Phe His Arg Val Asp Gln Lys Glu Ile Thr Gln Leu	2082 592
TCC CAC TTG GGC CAG GGC ACA AGG ACC AAC GTG TAT GAG GGC CGC CTG Ser His Leu Gly Gln Gly Thr Arg Thr Asn Val Tyr Glu Gly Arg Leu	2130 608
CGA GTG GAG GGC AGC GGG GAC CCT GAG CAG GCC AAC ATC GAT GAC GAG Arg Val Glu Gly-Ser Gly Asp Pro Glu Glu Gly Lys Met Asp Asp Glu	2178 624
GAC CCC CTC GTG CCT GGC AGG GAC CGT GGG CAG GAG CTA CGA GTG GTG Asp Pro Leu Val Pro Gly Arg Asp Arg Gly Gln Glu Leu Arg Val Val	2226 640
CTC AAA GTG CTG GAC CCT AGT CAC CAT GAC ATC GCC CTG GCC TTC TAC Leu Lys Val Leu Asp Pro Ser His His Asp Ile Ala Leu Ala Phe Tyr	2274 656
GAG ACA GCC AGC CTC ATC AGC CAG GTC TCC CAC ACG CAC CTG GCC TTC Glu Thr Ala Ser Leu Met Ser Gln Val Ser His Thr His Leu Ala Phe	2322 672
GTG CAT GGC GTC TGT GTG CGC GGC CCT GAA AAT AGC ATG GTG ACA GAG Val His Gly Val Cys Val Arg Gly Pro Glu Asn Ser Met Val Thr Glu	2370 688
TAC GTG GAG CAC GGA CCC CTG GAT GTG TGG CTG CGG AGG GAG CGG GGC Tyr Val Glu His Gly Pro Leu Asp Val Trp Leu Arg Arg Glu Arg Gly	2418 704
CAT GTG CCC ATG GCT TGG AAG ATG GTG GTG GCC CAG CAG CTG GCC AGC His Val Pro Met Ala Trp Lys Met Val Val Ala Gln Gln Leu Ala Ser	2466 720
GCC CTC AGC TAC CTG GAG AAC AAG AAC CTG GTT CAT GGT AAT GTG TGT Ala Leu Ser Tyr Leu Glu Asn Lys Asn Leu Val His Gly Asn Val Cys	2514 736
GGC CGG AAC ATC CTG CTG GCC CGG CTG GGG TTG GCA GAG GGC ACC AGC Gly Arg Asn Ile Leu Leu Ala Arg Leu Gly Leu Ala Glu Gly Thr Ser	2562 752
CCC TTC ATC AAG CTG ACT GAT CCT GGC GTG GGC CTG GGC GCC CTC TCC Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Val Gly Leu Gly Ala Leu Ser	2610 768
AGG GAG GAG CGG GTG GAG AGG ATC CCC TGG CTG GCC CCC GAA TGC CTA Arg Glu Glu Arg Val Glu Arg Ile Pro Trp Leu Ala Pro Glu Cys Leu	2658 784
CCA GGT GGG GCC AAC AGC CTA AGC ACC GCC ATG GAC AAG TGG GGG TTT Pro Gly Gly Ala Asn Ser Leu Ser Thr Ala Met Asp Lys Trp Gly Phe	2706 800
GGC GCC ACC CTC CTG GAG ATC TGC TTT GAC GGA GAG GCC CCT CTG CAG Gly Ala Thr Leu Leu Glu Ile Cys Phe Asp Gly Glu Ala Pro Leu Gln	2754 816
AGC CGC AGT CCC TCC GAC AAG GAG CAT TTC TAC CAG AGG CAG CAC CGG Ser Arg Ser Pro Ser Glu Lys Glu His Phe Tyr Gln Arg Gln His Arg	2802 832
CTG CCC GAG CCC TCC TGC CCA CAG CTG GCC ACA CTC ACC AGC CAG TGT Leu Pro Glu Pro Ser Cys Pro Gln Leu Ala Thr Leu Thr Ser Gln Cys	2850 848

【図11】

CTG ACC TAT GAG CCA ACC CAG AGG CCA TCA TTC CGC ACC ATC CTG CGT Leu Thr Tyr Glu Pro Thr Gln Arg Pro Ser Phe Arg Thr Ile Leu Arg	2898 864
GAC CTC ACC CGC GTG CAG CCC CAC AAT CTT GCT GAC GTC TTG ACT GTG Asp Leu Thr Arg Val Gln Pro His Asn Leu Ala Asp Val Leu Thr Val	2946 880
AAC CGG GAC TCA CCG GCC GTC GGA CCT ACT ACT TTC CAC AAG CGC TAT Asn Arg Asp Ser Pro Ala Val Gly Pro Thr Thr Phe His Lys Arg Tyr	2994 896
TTG AAA AAG ATC CGA GAT CTG GGC GAG GCT CAC TTC GGC AAG GTC AGC Leu Lys Lys Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Ser	3042 912
TTG TAC TGC TAC GAT CCG ACC AAC GAC GGC ACT GGC GAG ATG GTG GCC Leu Tyr Cys Tyr Asp Pro Thr Asn Asp Gly Thr Gly Glu Met Val Ala	3090 928
GTG AAA GCC CTC AAG GCA GAC TGC GGC CCC CAG CAC CGC TCG GGC TGG Val Lys Ala Leu Lys Ala Asp Cys Gly Pro Gln His Arg Ser Gly Trp	3138 944
AAG CAG GAG ATT GAC ATT CTG CGC ACG CTC TAC CAC GAG CAC ATC ATC Lys Gln Glu Ile Asp Ile Leu Arg Thr Leu Tyr His Glu His Ile Ile	3186 960
AAG TAC AAG GGC TGC TGC GAG GAC CAA GGC GAG AAG TCG CTG CAG CTG Lys Tyr Lys Gly Cys Cys Glu Asp Gln Gly Glu Lys Ser Leu Gln Leu	3234 976
GTC ATG GAG TAC GTG CCC CTG GGC AGC CTC CGA GAC TAC CTG CCC CGG Val Met Glu Tyr Val Pro Leu Gly Ser Leu Arg Asp Tyr Leu Pro Arg	3282 992
CAC AGC ATC GGG CTG GCC CAG CTG CTG CTC TTC GCC CAG CAG ATC TGC His Ser Ile Gly Leu Ala Gln Leu Leu Leu Phe Ala Gln Gln Ile Cys	3330 1008
GAG GGC ATG GCC TAT CTG CAC GCG CAC GAC TAC ATC CAC CGA GAC CTA Glu Gly Met Ala Tyr Leu His Ala His Asp Tyr Ile His Arg Asp Leu	3378 1024
GCC GCG CGC AAC GTG CTG CTG GAC AAC GAC AGG CTG GTC AAG ATC GGG Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Asp Asn Asp Arg Leu Val Lys Ile Gly	3426 1040
GAC TTT GGC CTA GCC AAG GCC GTG CCC GAA GGC CAC GAG TAC TAC CGC Asp Phe Gly Leu Ala Lys Ala Val Pro Glu Gly His Glu Tyr Tyr Arg	3474 1056
GTG CGC GAG GAT GGG GAC AGC CCC GTG TTC TGG TAT GCC CCA GAG TGC Val Arg Glu Asp Gly Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu Cys	3522 1072
CTG AAG GAG TAT AAG TTC TAC TAT GCG TCA GAT GTC TGG TCC TTC GGG Leu Lys Glu Tyr Lys Phe Tyr Tyr Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly	3570 1088
GTG ACC CTG TAT GAG CTG CTG ACG CAC TGT GAC TCC AGC CAG AGC CCC Val Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Thr His Cys Asp Ser Ser Gln Ser Pro	3618 1104
CCC ACG AAA TTC CTT GAG CTC ATA GGC ATT GCT CAG GGT CAG ATG ACA Pro Thr Lys Phe Leu Glu Leu Ile Gly Ile Ala Gln Gly Gln Met Thr	3666 1120
GTT CTG AGA CTC ACT GAG TTG CTG GAA CGA GGG GAG AGG CTG CCA CGG Val Leu Arg Leu Thr Glu Leu Leu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Pro Arg	3714 1136

CCC GAC AAA TGT CCC TGT GAG GTC TAT CAT CTC ATG AAG AAC TGC TGG	3762
Pro Asp Lys Cys Pro Cys Glu Val Tyr His Leu Met Lys Asn Cys Trp	1152
GAG ACA GAG GCG TCC TTT CGC CCA ACC TTC GAG AAC CTC ATA CCC ATT	3810
Glu Thr Glu Ala Ser Phe Arg Pro Thr Phe Glu Asn Leu Ile Pro Ile	1168
CTG AAG ACA GTC CAT GAG AAG TAC CAA GGC CAG GCC CCT TCA GTG TTC	3858
Leu Lys Thr Val His Glu Lys Tyr Gln Gly Gln Ala Pro Ser Val Phe	1184
AGC GTG TGC	3867
Ser Val Cys	1187

Western blot analysis showing the phosphorylation of Jak2 in various cell lines. The lanes are labeled at the top: NRS, α-Jak2, α-Jak2, Jak2, α-Jak2, Jak1, and α-Jak2. The molecular weight markers are indicated on the left: 215 kDa, 105 kDa, 70 kDa, and 43 kDa. The blot shows a strong band at approximately 105 kDa in the α-Jak2 lanes, indicating phosphorylation of Jak2. The Jak1 lane shows a band at approximately 105 kDa, indicating phosphorylation of Jak1. The α-Jak2 lanes show a band at approximately 43 kDa, indicating the presence of the α-Jak2 antibody.

【図14】

pileup.msf(Jak1)	..MQYLNKE	DCNAMAFCAK	MRSFKKTEVK	QVVP.EPGVE	VTFYLLDREP
pileup.msf(Tyk2)	MPLRHWGMAR	GSKPVG....DGAQ	PMAA.MGGLK	VLLHWAGPGG
pileup.msf(Jak2)	MGMACLTMT	MEATSTSPVH	QNGDIPGSAN	SVKQIEPVLQ	VYLYHSLGQA
コンセンサス	M-M--L-M-E	-----	-----A-	-V---EPGL-	V-LY-----
pileup.msf(Jak1)LRLGSG	EXTAEELCIR	AAQECISISPL	CHNLFALYDE	STKLWYAPNR
pileup.msf(Tyk2)	GEPWVTFSES	SLTAEVVCIH	IAHKVGITPP	CFNLFALFDA	QAQVWLPPNH
pileup.msf(Jak2)	EGEYLKFPSS	EYVAEEICVA	ASKACGITPV	YHNMFLMSE	TERIWYPPNH
コンセンサス	----L-FSG	EXTAE-CI-	AA--CGITP-	CHNLFAL-DE	----WYPPNH
pileup.msf(Jak1)	IITVDDKTSL	RLHYRMRFYF	TNWHCTNDNE	QSVWRHSPKK	QKNGYEKKRV
pileup.msf(Tyk2)	ILEIPRDASL	MLYFRIRFYF	RNWHGMNPRE	PAVYRCGPPG	TEASSD..QT
pileup.msf(Jak2)	VFHIDESTRH	DILYRIRFYF	PHWY.....CSGSS	RTYRYGVSRG
コンセンサス	I--ID--TSL	-L-YRIRFYF	-NWHG-N--E	--V-RCSP--	----Y---R-
pileup.msf(Jak1)	PEATPLLDAS	SLEYLFAQQQ	YDLIKFLAPI	RDPKTEQDGH	DIENECLGMA
pileup.msf(Tyk2)	AQCMQLDPA	SFEYLFQEQK	HEFVNDVASL	WELSTEEIHH	HFKNESLGMA
pileup.msf(Jak2)	AEA.PLLDDF	VMSYLFQWR	HDFVHGWIQVPVTH	ETQEECLGMA
コンセンサス	AEA-PLLD--	S-EYLFAQQ-	HDFV---A--	----TE---H	---NECLGMA
pileup.msf(Jak1)	VLAISHYAMM	KKMQLPELPK	DISYKRYIPE	TLNKSIRQRN	LLTRMRINNV
pileup.msf(Tyk2)	FLHLCHLALR	HGIPLEEVAK	KTSFKDCIPR	SFRHRIRQHS	ALTRLRLRNV
pileup.msf(Jak2)	VLDMMRIAKE	KDQTPLAVYN	SVSYKTFLPK	CVRAKIQDYH	ILTRKIRIRYR
コンセンサス	VL---H-A--	K---L-EV-K	--SYK--IP-	--R--IRQ--	-LTR-RIRNV
pileup.msf(Jak1)	FKDFLKEFNN	KTICDSSVST	HDLKVLYLAT	LETLTXYGA	EIFETSMILLI
pileup.msf(Tyk2)	FRRFLRDFQ.PGRLSQ	QVMVLYLAT	LERLAPRFGT	ERVVCHLRL
pileup.msf(Jak2)	FRRFIQF..	...SQCKATA	RNLKLYLIN	LETLSAFYT	EQFEV.....
コンセンサス	FRRFL--F--	-----S-	--LKVLYLAT	LETL---FGT	E-FEV--L--

【図17】

pileup.msf(Jak1)	INLKQQLXYA	IQICKGMYL	GSROYVHRDL	AARNVLVESE	HQVKIGDFGL
pileup.msf(Tyk2)	IGLAQLLLFA	QQICECMAYL	HAQHYIHRDL	AARNVLLDND	RLVKIGDFGL
pileup.msf(Jak2)	IDHKLLQYT	SQICKGMYL	CTKRYIHRDL	ATRNILVENE	NRVKIGDFGL
コンセンサス	I-LKQLL-YA	-QICKGM-YL	G---YIHRDL	AARNVLVENE	--VKIGDFGL
pileup.msf(Jak1)	TKAIETDKEY	YTVKDDRDSP	VFWYAPECLI	QCKFYIASDV	WSFGVTLHEL
pileup.msf(Tyk2)	AKAVPEGHEY	YRVREDGDS	VFWYAPECLK	EYKFYASDV	WSFGVTLXYEL
pileup.msf(Jak2)	TKVLPQDKEY	YKVKEPGESP	IFWYAPESLT	ESKFSVASDV	WSFGVVLXYEL
コンセンサス	TKA-P-DKEY	Y-VKEDGDS	VFWYAPECL-	ESKFSVASDV	WSFGVVLXYEL
pileup.msf(Jak1)	LTYCDSDFSP	MALFLKMIGP	T.HGQMTVTR	LVNTLKEGKR	LPCPPNCPDE
pileup.msf(Tyk2)	LTHCDSSQSP	PTKFLELIGI	A.QGQMTVLR	LTELLERGER	LPRPDKCPCE
pileup.msf(Jak2)	FTYIEKSKSP	PVEFMRMIGN	DKQGQMI VFH	LIELLSNGR	LPRPEGCPDE
コンセンサス	LTYCDS-SP	P--FL-MIG-	--QGQMTV-R	L-ELLK-G-R	LPRP--CPDE
pileup.msf(Jak1)	VYQLMRKCWE	FQPSNRRTTFQ	NLIEGFEALL	K.....
pileup.msf(Tyk2)	VYHLMKNCWE	TEASFRPTFE	NLIPILKTVH	EKYQGQAPS	FSVC*
pileup.msf(Jak2)	IXVIMTECHN	NNVSQRPSFR	DLSFGWIKSG	TV*.....
コンセンサス	VY-LM--CWE	---S-RPTF-	NLI-G-----	-----	-----

【図 15】

pileup.msf(Jak1)	SSENELSRCH	SNDS.....GNV	LYEVMVTGNL	GIQWRQKPNV
pileup.msf(Tyk2)	LAQAEGEPCY	IRD SGVAPTD	PGPESAAGPP	THEVLVTGTG	GIQWHPVEEE
pileup.msf(Jak2)KE	SARGPSGEEI	FATIIITGNG	GIQWS.....
コンセンサス	----E---C-	--DS-----	-----G--	--EV-VTGNG	GIQWS-----
pileup.msf(Jak1)	VPVEKE....KNKLR	RKKLEYNKHK	KDDERNKLRE	EWNNFYSYFPE
pileup.msf(Tyk2)	VNKEECSSGS	SGRNPQASLF	GKKAKAHKAF	GQPADRPREP	LWAYFCDFRD
pileup.msf(Jak2)RGK	HKESETLTEQ	DVQLYCDFPD
コンセンサス	V--E-----	-----L-	-KK-----K-K	-----E-	-W--FCDFPD
pileup.msf(Jak1)	ITHIVIKE..SVV	SINKQDNKNM	ELKLSSREEA	LSFVSLVDGY
pileup.msf(Tyk2)	ITHVVLKE..HCV	SIHRQDNKCL	ELSLPSRAAA	LSFVSLVDGY
pileup.msf(Jak2)	IIDVSIKQAN	QECSNESRIV	TVHKQDGKVL	EIELSSLKEA	LSFVSLIDGY
コンセンサス	ITHVVIKE--	-----V	SIHKQDNK-L	EL-LSSR-EA	LSFVSLVDGY
pileup.msf(Jak1)	FRLTADAHHY	LCTDVAPPLI	VHNIQNGCHG	PICTEYAINK	LRQEGSEEGM
pileup.msf(Tyk2)	FRLTADSSHY	LCHEVAPPRL	VMSIRDGING	PLLEPFVQAK	LR...PEDGL
pileup.msf(Jak2)	YRLTADAHHY	LCKEVAPPAV	LENIHNSCHG	PISMDFAIK	LKKAGNQTGL
コンセンサス	FRLTADAHHY	LC-EVAPP--	V-NI--GCHG	PI---FAI-L	LR--G-E-GL
pileup.msf(Jak1)	YVLRWSCTDF	DNILMTVTCG	EKSEVLGGQK	..QFNFAQIE	VQKFRYSLHG
pileup.msf(Tyk2)	YLIHWSTSHP	YRLILTVA..	QRSQAPDGMQ	SLRLRKFPPIE	QQDGAFVLEG
pileup.msf(Jak2)	YVLRCSPKDF	NKYFLTFA.V	ERENVIEYKH	CLITKN....	.ENGEYNLSG
コンセンサス	YVLRWS--DF	----LTVA--	ERS-V--G--	-L--KNF-IE	-Q-G-Y-L-G
pileup.msf(Jak1)	SMDHFPSLRD	LMNHLKKQIL	RTDNISFVLK	RCCQPKPREI	SNLLV.....
pileup.msf(Tyk2)	WGRSFPSVRE	LGAALQGCLL	RAGDDCFSLR	RCCLPQPGET	SNLIT.....
pileup.msf(Jak2)	TKRNFSNLKD	LLNCYQMETV	RSDSIIFQFT	KCCPPKPKDK	SNLLVFRITNG
コンセンサス	--R-FPSLRD	L-N-LQ---L	R-D-I-F-L-	RCC-PKP-E-	SNLLV-----
pileup.msf(Jak1)	..ATKKAQEW	QPVYSMSQLS	FDRILKKDII	QGEHLGRGTR	THIYSGTLL.
pileup.msf(Tyk2)	...MRGARAS	PRTLNLSQLS	FHRVDQKEIT	QLSHLGQGTR	TNVYEGRLAV
pileup.msf(Jak2)	ISDVQISPTL	QRHNNVNQMV	FHKIRNEDLI	FNESLGQGTF	TKIFKGVRRRE
コンセンサス	-----A---	QR--N-SQLS	FHRI--KDII	Q-BHLGQGTR	T-IY-G-LR-

【図16】

pileup.msf(Jak1)D	YKDEEGIAEE	K....KIKVI	LKVLDPSHRD	ISLAFEEAAS
pileup.msf(Tyk2)	EGSGDPPEGK	MDDEDPLVPG	RDRGQELRVV	LKVLDPSHRD	IALAFYETAS
pileup.msf(Jak2)VGD	YGQLHKTEVL	LKVLDKAHRN	YSESPFEAAS
コンセンサス	-----	--DE---V--	-----K--V-	LKVLDPSHRD	ISLAFEEAAS
pileup.msf(Jak1)	MMRQVSHXHI	VYLYGVCVRD	VENIMVZEEFV	EGGPLDLFMH	RKSDALTTFW
pileup.msf(Tyk2)	LMSQVSHTHL	AFVHGVCVRG	PENIMVTEYV	EHGFLDVWLR	RERGHVPMAW
pileup.msf(Jak2)	MMSQLSHKHL	VLNYGVCVCG	EENILVQEFV	KFGSLDTYK	KNKNSINILW
コンセンサス	MMSQVSHKHL	V--YGVCVRG	-ENIMV-EFV	E-GPLD--L-	R-----W
pileup.msf(Jak1)	KFKVAKQLAS	ALSYLEDKDL	VHGNVCTKNL	LLAR.EGIDS	DIGPFIKLS
pileup.msf(Tyk2)	KMVVAQQLAS	ALSYLENKNL	VHGNVCCRN	LLAR.LGLAE	GTSPFIKLS
pileup.msf(Jak2)	KLGVAKQLAW	AMHFLEEKSL	IHGNVCAKNI	LLIREEDRRT	GNPPFIKLS
コンセンサス	K--VAKQLAS	ALSYLE-L-L	VHGNVC-KNI	LLAR-EG---	G--PFIKLS
pileup.msf(Jak1)	PGIPVSVLTR	QECIERIPWI	APECVEDSKN	.LSVAADKWS	FGTTLWEICY
pileup.msf(Tyk2)	PGVGLGALS	EERVERIPWL	APECLPGGAN	SLSTAMDKWG	FGATLLEICF
pileup.msf(Jak2)	PGISITVLPK	DILQERIPWV	PPECIENPKN	.LNLATDKWS	FGTTLWEICS
コンセンサス	PGI---VL-R	-E--ERIPW-	APEC-E--KN	-LS-A-DKWS	FGTTLWEIC-
pileup.msf(Jak1)	NGEIPDKDT	LIEKERFYES	RCRPVTPSCK	ELADLMTRCM	NYDPNQRPFF
pileup.msf(Tyk2)	DGEAPLQSR	PSEKEHFFQR	QHRLPEPSCP	QLATLTSQCL	TYEPTQRPFF
pileup.msf(Jak2)	GGDKPLSALD	SQRKLQFYED	KHQLPAPKWT	ELANLINNCH	DYEPDFRPAF
コンセンサス	-GE-PL----	--EKE-FYE-	-HRLP-PSC-	ELA-L---CM	-YEP-QRP-F
pileup.msf(Jak1)	RAIMRDINKLE	EQN.PDI...	.VSEKQPTTE	VDPHFKEKRF
pileup.msf(Tyk2)	RTILRDLTRLQ	PHNLADV...	.LTVNPDSPA	SDPTVFHKRY
pileup.msf(Jak2)	RAVIRDLNSL	FTPDYELLTE	NDMLPNMRIG	ALGFSGAFED	RDPTQFEERH
コンセンサス	RAI-RDLN-L	-----E	--NLPD----	-L-----	-DPT-FEKR-
pileup.msf(Jak1)	LKKRIRDLGEG	HFGKVELCRY	DPECNDTGEQ	VAVKSLKPES	CGNHIADLKK
pileup.msf(Tyk2)	LKKIRDLGEG	HFGKVSLEYCY	DPTNDGTGEM	VAVKALKADC	CPQHRSGWKQ
pileup.msf(Jak2)	LKFLQQLGKG	NFGSVEMCRY	DPLQDNTGEV	VAVKKLQ.HS	TEEHLRDFER
コンセンサス	LK-IRDLGEG	HFGKVELCRY	DP--DNTGE-	VAVK-LK--S	G--H--D-K-
pileup.msf(Jak1)	EIEILRNLYH	ENIVKYKGIC	MEDGGNGIKL	IMEFLPSGSL	KEYLPKNKNK
pileup.msf(Tyk2)	EIDILRTLYH	EHIIKYKGCC	EDQGEKSLQL	VMEYVPLGSL	RDYLP..RHS
pileup.msf(Jak2)	EIEILKSLQH	DNVKGVCVCQ	YSAGRRNLRL	IMEYLPYGS	RDYLPQKHKE
コンセンサス	EIEILR-LYH	ENIVKYKG-C	---G---L-L	IMEYLP-GSL	RDYLPK-K---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 ブルース・エイ・ウィザン
アメリカ合衆国38122テネシー州メンフィ
ス、シャルウッド3550番

(72)発明者 フレデリック・ダブリュー・クエル
アメリカ合衆国38018テネシー州コルドバ、
エリクソン・コウプ8579番

(72)発明者 オリー・シルベノイネン
アメリカ合衆国10021ニューヨーク州ニュ
ーヨーク、ヨーク・アベニュー1161番 ア
パートメント・ナンバー2エイチ